

AASIANKILPIKIERRON MIKROVILJELMÄN ALOITUS



Ammattikorkeakoulun opinnäytetyö

Puutarhatalouden koulutusohjelma

Lepaa, kevät 2016

Paulina Tirkkonen

LEPAA

Puutarhatalouden koulutusohjelma

Tekijä

Paulina Tirkkonen

Vuosi 2016

Työn nimi

Aasiankilpikierron mikroviljelmän aloitus

TIIVISTELMÄ

Opinnäytetyön tarkoituksena oli löytää aasiankilpikierrolle (*Menispermum dauricum*) sopiva aloitusala sekä sterilointimenetelmä mikrolisäämistä varten. Opinnäytetyön tilaaja oli Hämeen ammattikorkeakoulun Lepaan yksikön mikrolisäyslaboratorio. Onnistuneesti aloitettua solukkoviljelmää voidaan jatkossa käyttää aasiankilpikierron monistamiseen mikrolisäyslaboratoriossa.

Toiminnallinen osuus suoritettiin alkuvuodesta 2016 Lepaan yksikön mikrolisäyslaboratoriossa. Emokasvit kasvoivat Lepaan yksikön puistossa ja ne hyödettiin Lepaan kasvihuoneessa. Niistä otettiin lisäysmateriaaliksi hyötyneitä jälkisilmuja eli juurivesoja. Lisäysmateriaalin sterilointiin käytettiin menetelmää, jossa tehtiin saippuapesu sekä etanoli- ja natriumhypokloriittikäsittely. Aloitusaloja valittiin neljä: MS + BAP 0,5 mg/l + adeniinisulfaatti 50 mg/l + glutamiini 150 mg/l; WPM + BAP 0,5 mg/l + adeniinisulfaatti 50 mg/l + glutamiini 150 mg/l; MS + BAP 2,0 mg/l ja WPM + BAP 2,0 mg/l. Aloitusaloitustavainnoilla haluttiin vertailla MS (Murashige & Skoog) ja WPM (woody plant medium) perusreseptityyppejä sekä kasvihormoni BAP:n eri pitoisuuksia, joita adeniinisulfaatti ja glutamiini kompensoivat.

Koeputkiin hankasilmuista perustettuja aloituksia havainnoitiin neljän viikon ajan kerran viikossa. Havainnoinneissa tarkkailtiin kasvua, ja kirjattiin ylös kuolleiden ja infektoituneiden aloitusten määrä. Lisäaineellisilla aloustoilla kasvaneet aloitukset kasvoivat paremmin ja muistuttivat eniten aikuisen aasiankilpikierron fenotyyppiä. Infektioita esiintyi kaikilla neljällä alustalla ja yhteensä aloituksista infektoitui 64 %. Kuolleita aloituksia ei esiintynyt lainkaan. Aloitusvaiheen jälkeen aloitukset siirrettiin monistusaloistoille.

Lisäaineellisia aloitusaloja voidaan todennäköisemmin käyttää aasiankilpikierron mikrolisäämiseen kuin lisäaineettomia aloitusaloja. Käytetty sterilointikäsittely toimi hyvin aasiankilpikierrolla. Emokasvimateriaalin hyötäminen todennäköisesti vähensi infektioiden määrää.

Avainsanat Mikrolisäys, aasiankilpikierto, *Menispermum dauricum*, aloitusala

Sivut 30 s. + liitteet 3 s.

LEPAA

Degree Programme in Horticulture

Author

Paulina Tirkkonen

Year 2016

Subject of Bachelor's thesis

Starting a Microculture of the Asian Moonseed

ABSTRACT

The purpose of this thesis was to find a suitable medium and sterilization method for micropropagation of Asian moonseed (*Menispermum dauricum*). The commissioner of this thesis was the micropropagation laboratory of Lepaa unit in Häme University of Applied Sciences. Successfully started tissue cultures can be used to multiply Asian moonseed in micropropagation laboratories in the future.

The practical part was carried out in the micropropagation laboratory of Lepaa unit in early 2016. Parent plants grew in the park of Lepaa unit and they were forced in a greenhouse in Lepaa. Forced adventitious buds or suckers from them were chosen as the propagation material. The sterilization method was used to sterilize the propagation material, which included soap wash and ethanol and sodium hypochlorite treatment. Four initiation media were made: MS + BAP 0,5 mg/l + adenine sulphate 50 mg/l + glutamine 150 mg/l, WPM + BAP 0,5 mg/l + adenine sulphate 50 mg/l + glutamine 150 mg/l, MS + BAP 2,0 mg/l and WPM + BAP 2,0 mg/l. These media were chosen to compare MS (Murashige & Skoog) and WPM (woody plant medium) basic recipes and different concentrations of plant hormone BAP which adenine sulphate and glutamine compensate.

The adventitious shoot culture was established in to test tubes and initiations were observed once a week for four weeks. In the observations the growth of the initiations was monitored and the number of the dead and infected initiations was written down. The growth was better looking and the growth reminds more of the phenotype of an adult plant of Asian moonseed in media with additives. Infections appeared in all four media and in all 64 % of all initiations were infected. None of the initiations died. After stage II the initiations were transferred in to multiplication media.

The media with additives can more likely be used as an initiative medium for Asian moonseed. The used sterilization method worked well for Asian moonseed. Forcing the parent plant material likely reduced the number of infections.

Keywords Micropropagation, Asian moonseed, *Menispermum dauricum*, medium

Pages 30 p. + appendices 3 p.

TERMIT JA LYHENTEET

2,4-D	2,4-dikloorifenoksietikkahappo, synteettinen auksiini, (<i>2,4-Dichlorophenoxyacetic acid</i>)
2iP	Isopentenyladeniini, synteettinen sytokiniini, (<i>N6-Isopentenyladeninen</i>)
agar	Punaleivistä eristetty hiilihydraattipolymeeri, jota käytetään mikrolisäyksessä ravintoalustojen kiinteyttämiseen
aloituskasvualusta	Ravintoalusta, johon mikroviljelmä aloitetaan. Sisältää reseptin mukaisen ravintoalustan (kantaliuoksia, hormoneja ja sokereita) ja hyödyttävän aineen. Aloitus tehdään usein koeputkiin.
aseptinen	Mikrobittomissa olosuhteissa
autoklaavi	(tarkemmin: höyryautoklaavi) Sterilointiin käytettävä suljettava paineastia, jonka toiminta perustuu 121 °C lämpötilaan, 1 baarin ylipaineeseen sekä kylläiseen vesihöyryyn. Sterilointikäsittely kestää 15 minuuttia. Käytetään työvälineiden, astioiden ja ravintoalustojen sterilointiin.
BAP, BA	6-bentsyyliaminopuriini/bentsyladeniini, kasvihormoneja, jotka ovat synteettisiä sytokiniineja, (<i>6-bentsyliaminopurine/benzylamine</i>)
<i>ex vitro</i>	Ei lasin sisällä, normaaleissa lisäysolosuhteissa
IAA	Indolyylietikkahappo, ensimmäisenä löydetty kasvihormoni, luontainen auksiini, (<i>indole-3-acetic acid</i>)
IBA	Indolivoihappo, luontaisesti esiintyvä auksiini, (<i>indole-3-butyric acid</i>)
<i>in vitro</i>	Lasin sisällä, usein koeputkessa tai lasipurkissa
kasvihormoni	Kasvien itsensä tuottamia tai synteettisiä aineita, jotka vaikuttavat kasvin kasvuun, kehitykseen ja aineenvaihduntaan. Vaikuttavat jo hyvin pieninä pitoisuuksina.
KIN	Kinetiini, luontainen sytokiniini, (<i>kinetin</i>)

laminaarivirtauskaappi	Steriili työskentelytila, jossa koneisto puhaltaa puhdasta ilmaa pois päin työskentelytilasta, jolloin huoneilma ja siinä olevat epäpuhtaudet eivät pääse kosketuksiin kaapin sisällä olevien steriilien esineiden ja mikrolisättävien kasvien kanssa.
mikrolisäys	Kasvin solujen, solukoiden ja kasvin osien viljelyä aseptisissä olosuhteissa ravintoalustalla
MS-alusta	Toshio Murashigen & Folke K. Skoogin kehittämä kasvu-alustaresepti ruohovartisille kasveille, kehitetty 1962
NAA	α -naftaleenietikkahappo, synteettisesti valmistettu aukiini, (<i>naphthalene acetic acid</i>)
steriili/sterilointi	Mikrobeista puhdistettu/mikrobeista puhdistaminen
WPM-alusta	Gregory Llyod & Brent McCown kehittämä kasvualustaresepti puuvartisille kasveille, kehitetty 1981, (<i>woody plant medium</i>)

SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	1
2	MENISPERMACEAE-HEIMO	2
2.1	Kilpikierrot Suomessa	2
2.2	Lisäämistavat.....	4
3	MIKROLISÄÄMINEN	4
3.1	Mikrolisäämisen vaiheet	5
3.2	Mikrolisäyslaboratorion käytäntöjä ja välineistöä	5
3.3	Mikrolisäämisen vahvuudet ja heikkoudet.....	6
3.3.1	Vahvuudet.....	7
3.3.2	Heikkoudet	7
3.4	Kasvihormonit.....	8
3.4.1	Auksiinit	8
3.4.2	Sytokiniinit	9
3.5	Kasvien regeneraatiokyky	9
3.6	Infektiot ja muut kasvua heikentävät tekijät	10
3.6.1	Tuholaiset	10
3.6.2	Mikrobit.....	10
3.6.3	Infektioiden ennaltaehkäisy	11
3.6.4	Pintasterilointi.....	11
3.6.5	Fenolit.....	12
3.7	Hyötäminen	13
3.8	Ravintoalustat.....	13
3.9	Aloitusaluksien valitsemiseen vaikuttaneet tekijät	14
4	AINEISTO.....	15
4.1	Lisäys- ja aloitusmateriaalin valitseminen	15
4.2	Aloitusaluksien valitseminen	16
5	MENETELMÄT.....	17
5.1	Aloitusaluksien tekeminen	17
5.2	Sterilointi.....	18
6	TULOKSET	20
6.1	Tulokset havainnointipäivittäin.....	20
6.2	Eroavaisuudet aloitusten kasvutavassa.....	22
6.3	Monistusvaihe	23
6.4	Tulosten tulkinta.....	25
6.5	Kehitysideat.....	26
7	JOHTOPÄÄTÖKSET	27
	LÄHTEET	29

Liite 1	MS-alusta
Liite 2	WPM-alusta
Liite 3	Havainnointitaulukko

1 JOHDANTO

Kilpikiertokasvit-heimon (*Menispermaceae*) kasveja, johon kilpikierrat lukeutuvat, on tutkittu lähinnä lääketieteellisuuden käyttöä varten niiden luontaisella levinneisyysalueella Itä-Aasiassa. Suomessa kilpikiertoja käytetään koristekasveina. Tutkimusta kilpikiertojen mikrolisäämisestä Euroopassa on tehty vähän, joka näkyy vähäisten julkaisujen määrässä. Suomessa ei ole asiaa oletettavasti tutkittu lainkaan. Tutkimustuloksia aasiankilpikierron onnistuneesta mikrolisäämisestä ei ole. Kokeita tulee tehdä lisää, jotta mikrolisäämistä voidaan pitää kilpikiertojen lisäämisen keinona.

Mikrolisäämisessä kasvualusta koostuu makro- ja mikroravinteista, energianlähteestä ja vitamiineista, hormoneista ja mahdollisista muista lisäaineista. Kasvit vaativat kuitenkin näiden aineiden erilaisia pitoisuuksia muodostaakseen versoja ravintoalustalla. Oikeanlaisen ravintoalustan löytäminen vaatii tutkimusta, jos sitä ei jo aiemmin ole tehty tai tutkimuksista ei tiedetä.

Ongelmia aloitusaloitusten ja -materiaalin valinnassa voivat tuottaa aasiankilpikierron regeneraatiokyky sekä version osittainen puutuminen. Aasiankilpikierto (*Menispermum dauricum*) on sekä ruoho- että puuvartinen kasvi, joka asettaa tiettyjä ehtoja aloitusaloitusten perusreseptivalinnoissa. Opinnäytetyö pyrkii ottamaan kantaa molempiin ongelmiin lisäysmateriaalin sekä vertailtavien aloitusaloitusten valinnalla.

Kasvin pinnalla elää infektioita aiheuttavia tekijöitä, jotka pyritään poistamaan pintasteriloinnilla ennen viljelmän aloittamista. Infektion sisältämät viljelmit ovat käyttökelvottomia. Sterilointikäsittelyjä on monenlaisia, ja ne sisältävät erilaisia aineita ja vaiheita. Toiset käsittelyt tehoavat mikrobeihin heikosti, toiset taas saattavat olla niin voimakkaita, että tuhoavat myös steriloitavan kasvin. Käsittelyn tehoon vaikuttaa olennaisesti kasvin pinnan rakenne. Opinnäytetyössä pyritään löytämään sterilointikäsittely, joka ei ole liian tehokas, mutta tehoaa myös mikrobeihin kohtuullisesti.

Hämeen ammattikorkeakoulun Lepaan yksikön mikrolisäyslaboratorion kautta opinnäytetyön tilanteen suomalaisen taimiston tarve lisätä aasiankilpikiertoa vuodessa on määrällisesti suuri. Tarvemäärän nähden nykyiset lisäystekniikat ovat hitaita. Mikrolisääminen mahdollistaa muun muassa kasvimassan lisäämisen nopeasti, taimien tasalaatuisuuden ja puhtauden kasvipatogeeneista. Koska virallisia tutkimuksia aiheesta ei ole aiemmin tehty Suomessa, Lepaan mikrolisäyslaboratorioon perustetaan mikroviljelmiä. Opinnäytetyön tarkoitus on selvittää, millä aloitusaloitustalla aasiankilpikierron mikrolisäys voidaan aloittaa. Onko aasiankilpikierron lisääminen mikrolisäyslaboratoriossa mahdollista? Millaisen aloitusaloitustan se vaatii?

2 MENISPERMACEAE-HEIMO

Menispermaceae eli kilpikiertokasvit ovat kaksisirkkaisia köynnöksiä. Heimoon kuuluvat köynnökset ovat usein puuvartisia, mutta heimoon kuuluu joitakin pensaita, puita ja ruohovartisia lajeja. Kilpikiertokasvit muodostavat keväisin juurivesoja ja siten muodostavat uusia versoja joka vuosi. Niiden lehdet ovat sijoittuneet versolle kierteisesti. Lehti on kilpimäinen ja lapa kulmikas. Kilpikiertokasvit kukkivat pienin vaaleankeltaisin tai -vihrein kukin, jotka ovat lehvästön alla piilossa (Alanko & Kahila 2003, 62). Kukinto on terttumainen huiskilo, ja sen kukat ovat yksineuvoisia. Koiras- ja naaraspuoliset kukat sijaitsevat eri yksilöissä eli kilpikiertokasvit ovat kaksikotisia. Hedelmöittyneistä kukista muodostuu hedelmiä, jotka ovat luumarjoja. Endokarppi on kaareva ja uurteinen. (Wilkinson 1980, 801-802.)

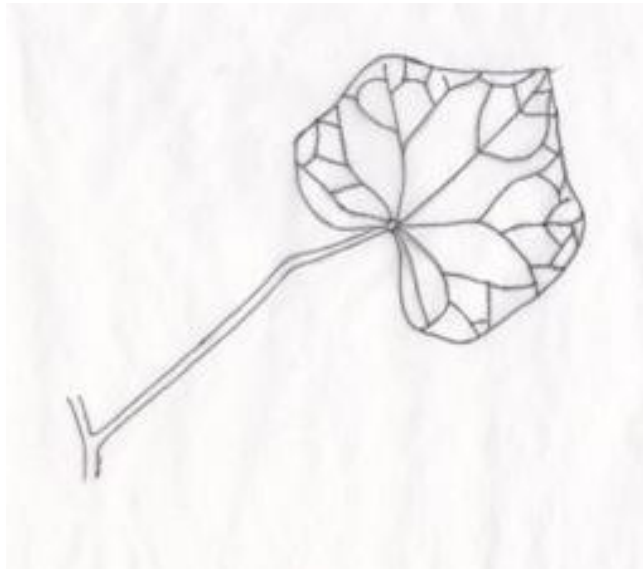
Kilpikiertokasvit kasvavat pääasiassa trooppisissa sademetsissä. Kilpikiertokasveja käytetään lääke- ja rohdoskasveina varsinkin niiden luonnollisilla levinneisyysalueilla Etelä-Aasiassa, Keski- ja Etelä-Afrikassa, Etelä-Amerikassa ja Pohjois-Amerikan eteläosissa. (Wilkinson 1980, 801-802.) Niitä käytetään lääke- ja rohdoskasveina muun muassa niiden erittämien alkaloidien takia. *Tinospora cordifolia* ja *Cocculus hirsutus* ovat lääkekasveja, joilla on parantavia vaikutuksia. *T. cordifolia*sta valmistettavaa lääkettä käytetään ihmisen diabeteksen oireiden vähentämiseen ja immuunijärjestelmän parantamiseen (Sharma ym, 2015). *C. hirsutus* parantaa haavoja ja paiseita (Meena, Singh & Patni 2012). Sharman, Vashisthan, Singhin & Kumarin (2015) ja Meenan, Singhin, & Patnin (2012) mukaan lääketeollisuudessa käytettäviä kilpikiertokasveja on vaikea lisätä tai niitä on muuten vähän. Esimerkiksi Intian ja Sri Lankan alueella kasvavaa *Coscinium fenestratum*-lajia käytetään lääkekasvina ja sitä on hakattu metsistä lääketeollisuuden käyttöä varten. Laajojen hakkuiden takia *C. fenestratum* on luokiteltu uhanalaiseksi lajiksi. (Senarath, 2010.) Kilpikiertokasvien heimoon kuuluvia kasveja on niiden hyödyllisyyden takia tutkittu paljon ja yritetty lisätä mikrolisäyksen keinoin.

2.1 Kilpikierrat Suomessa

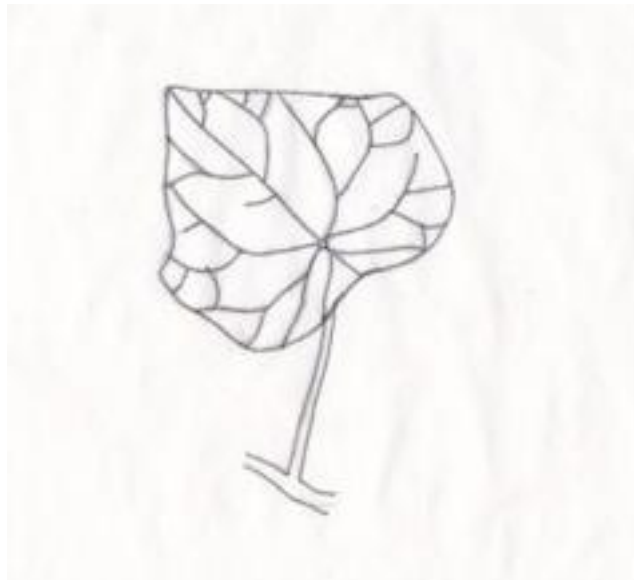
Kilpikierrat (*Menispermum*) ovat kilpikiertokasvien heimoon kuuluvia köynnöskasveja, joita käytetään Suomessa koristekasveina. Niiden koriste-arvo on peittävässä lehvästössä (Alanko & Kahila 2003, 62). Kilpikierrat ovat kesävihantia, joiden versot toisinaan puutuvat tyvestä. Ne kasvavat 2-3 metriä korkeiksi ja vaativat kasvaessaan tukea. Ne kiinnittyvät tukeen kiertymällä. Kilpikierrat kukkivat Suomessa kesäkuussa pienin vaaleankeltaisin kukin. Raaka marja on vaalean vihreä ja kypsyessään se muuttuu tumman siniseksi. (Alanko 1988, 161.) Siemen on puolikuun muotoinen ja niitä on vain yksi jokaisessa marjassa (Alanko & Kahila 2003, 62).

Suomessa myydään koristekasvina kahta eri kilpikiertoa. Kanadankilpikierto (*M. canadence*) on kotoisin Pohjois-Amerikan itäosista. Aasiankilpikierto (*M. dauricum*) kasvaa nimensä mukaisesti Itä-Aasiassa. Suomessa ne menestyvät vyöhykkeillä I-V. Nämä lajit voidaan erottaa toisistaan siitä, että kanadankilpikierron lehden lehtiruoti on kiinnittynyt aivan lavan

laitaan (Kuva 1.) ja sen versojen kärjet ovat aluksi karvaiset. Aasiankilpikierron lehtiruoti on kiinnittynyt enemmän lavan keskusta päin (Kuva 2.), ja sen versojen kärjet ovat kaljuja. Kilpikierrat kasvavat aurinkoisen tai puolivarjoisen paikalla. Ne vaativat tuoreen ja kostean kasvupaikan, joka on humuspitoinen. Ravinteita ne tarvitsevat keskimukaisesti tai runsaasti. Molemmat kilpikierrat ovat myrkyllisiä (Alanko & Kahila 2003, 63). Suomessa ei tavata kasvintuhoojia, jotka olisivat suureksi haitaksi tai vaaraksi kilpikiertoille. (Alanko 1988, 161.)



Kuva 1. Kanadankilpikierron lehti. Lehtiruoti kiinnittyy lavan laitaan. (Kuva: Paulina Tirkkonen 2016)



Kuva 2. Aasiankilpikierron lehti. Lehtiruoti kiinnittyy keskeemmälle lehden lapaa. (Kuva: Paulina Tirkkonen 2016)

2.2 Lisäämistavat

Kilpikiertoa lisätään siemenistä, taivukkaista, juurivesoista ja pistokkaista (Alanko & Kahila 2003, 46). Kilpikierrat ovat luomarjoja (Alanko & Kahila 2003, 62), joten siemen muodostuu hedelmän puutuneen hedelmäseinän sisälle. Kukkien hedelmöittyminen vaatii koiras- ja naarasyksilöiden viljelyn samalla alueella, sillä kasvit ovat kaksikotisia. Jos kasvipopulaatioon kuuluu vain toista sukupuolta, kukat eivät hedelmöity ja siemeniä ei muodostu. Kilpikiertojen marjat sisältävät myrkyllistä alkaloidia. Syötynä marjat kykenevät tappamaan lapsen. Marjoja voi helposti luulla viinirypäleiksi, joten marjojen muodostumattomuus voi olla koristekasvina myös hyvä ominaisuus, jotta vaaraa ei synny. (Brill 1994, 165.) Siemenet vaativat 2-3 kuukauden kylmäsäilytystä pystyäkseen itämään (Alanko & Kahila 2003, 46).

Kasvullinen lisääminen perustuu kasvien kykyyn muodostaa jälkijuuria, jälkisilmuja ja kallusta eli kykyyn uudistua. Taivukkaista lisättynä uudet taimet ovat emokasvissa kiinni juurruttamisen ajan. Vanhempaa versoa taivutetaan maahan, jolloin versoon muodostuu jälkijuuria sen ollessa kosketuksissa kasvualustan kanssa. Uudet taimet irrotetaan emokasvista juurtumisen jälkeen ja siirretään astioihin. Taivukaslisääminen voi olla hidasta. Usein juurtuminen tapahtuu vasta seuraavana kesänä ja soveltuukin siksi lähinnä pienimuotoiseen lisäämiseen. Taimia voidaan kuitenkin saada yhdestä taivukkaasta useampi kuin yksi. (Alanko & Kahila 2003, 41.)

Juurivesat ovat juuriin muodostuneista silmuista kasvuun lähteneitä versoja, joiden avulla muun muassa kilpikierrat uusiutuvat joka kevät. Köynnöksiä voidaan lisätä kaivamalla vesoja maasta 20-30 cm syvyydeltä ja sijoittamalla uuteen kasvupaikkaan tai astiaan. (Alanko & Kahila 2003, 39). Pistokasliäyksessä kasvusta leikataan uusimpia vuosikasvaimia kesäkuussa. Aasiankilpikierron tapauksessa verso voi olla ruohomainen tai osittain puutunut. Pistokkaaseen jätetään kaksi lehtiparia ja alimmat lehdet poistetaan. Juurrutuslupina voidaan käyttää turpeen ja hiekan tai perliitin yhdistelmää. Pistokas pistetään juurrutuslupinaan työntämällä varsi alustaan pystyasennossa. Varren tyveen muodostuu jälkijuuria ja ylin lehtisilmu puhkeaa kasvuun. Kasvullisten lisäämiskeinojen ongelma on, että ne vaativat paljon emokasveja. Lisäys on myös hidasta, sillä se voi viedä useamman kuin yhden kasvukauden. (Alanko & Kahila 2003, 40.)

3 MIKROLISÄÄMINEN

Mikrolisäämisestä kertovia keskeisiä teoksia ovat muun muassa *Plant Propagation by Tissue Culture* (3rd Edition) vuodelta 2008, jonka kirjoittajia ovat George, E. F., Hall, M. A. ja De Klerk, G-J., sekä *Hartmann & Kester's Plant Propagation: Principles and Practices (Part 1)* vuodelta 2014, jonka kirjoittajia ovat Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T. Jr. ja Geneve, R. L.

Mikrolisääminen on kasvullisen lisäämisen muoto, jossa tuotetaan genotyyppiltään identtisiä kasveja eli klooneja (Hartmann, Kester, Davies & Geneve 2014, 618). Viljelmä voidaan aloittaa lähes mistä vain kasvinosas-

ta: juuri, varsi, lehden pala, silmu, solu, alkio, ja niin edelleen. Mikrolisäys perustuu totipotenssi-teoriaan. Totipotenssi-teorian mukaan jokaisen kasvisolun on mahdollista kehittyä kokonaiseksi kasviksi, sillä jokainen solu sisältää informaation sitä varten. (Raven, Evert & Eichhorn 1992, 563). Mikroviljelmää kutsutaan myös kudosis- tai solukkoviljelmäksi, sillä se aloitetaan pienistä kasvinosista tai solukoista. Kasvatus tapahtuu aseptisissä olosuhteissa *in-vitro*, jossa viljelyolosuhteita, ja ravinteiden ja hormonien määrää voidaan kontrolloida. (Hartmann ym. 2014, 667.)

3.1 Mikrolisäämisen vaiheet

Mikrolisäyksen eteneminen jaetaan viiteen vaiheeseen: emokasvin valinta, aloitus, monistus, juurrutus ja karaiseminen. Tätä kaavaa käytetään tämän opinnäytetyön etenemisessä ja siitä suoritetaan kaksi ensimmäistä vaihetta. Emokasviksi valitaan lajille tai lajikkeelle fenotyypiltään tyypillinen yksilö, joka on terve. Emokasvilla ei saa olla näkyviä tautien tai tuholaisien oireita, sillä epäpuhtaudet saastuttavat solukkoviljelmän jo parin päivän sisällä. Kasvimateriaalin puhtaus varmistetaan puhdistamalla kasvimateriaalin pinta kemiallisilla aineilla.

Toista vaihetta nimitetään aloitukseksi. Aloitus koostuu aloitusalueen tekemisestä, solukon asettamisesta alustalle ja mikroversojen muodostumisesta. Kolmannessa vaiheessa mikroversoja monistetaan uusille alustoille pilkkomalla niitä osiin. Tavoitteena on mahdollisimman suuri monistusprosentti. Juurrutusvaiheessa mikrotaimet valmistellaan siirtymään *ex-vitro* olosuhteisiin. Juurrutusalueen koostumus edesauttaa juurien kasvua.

Karaiseminen on mikrolisäyksen kriittisin vaihe, sillä taimet saattavat kuivua olosuhteiden muutoksen takia. Kasvatusastiasa kasvaessaan taimet ovat saaneet säännöllisesti ja tarvittavan määrän ravinteita. Uusi orgaaninen kasvualusta, kuten turve-perliittiseos, ei sisällä tarkkaan mitattua määrää ravinteita. Myös ilman kosteusprosentti on ollut kasvatusastiasa korkea *ex vitro* olosuhteisiin verrattuna. Lehtien vahapinta on vielä heikosti kehittynyt tai sitä ei ole lainkaan, jonka takia haihdunta lehdistä on suuri. Taimet totutetaan uusiin, astian ulkopuolisiin olosuhteisiin, vähitellen. (George & Debergh 2008, 32; Hartmann ym. 2014, 676-678, 738-747.)

3.2 Mikrolisäyslaboration käytäntöjä ja välineistöä

Mikrolisääminen tapahtuu laboratoriossa, joka vaatii erityistä varustetasoa ja puhtaita työskentelytiloja. Mikrolisäyslaboratoriot voidaan jakaa niiden varustetason laajuuden mukaan tutkimus-, kaupallisiin ja pienlaboratorioihin. Lepaan mikrolisäyslaboratorio kuuluu näistä viimeiseen, sillä tutkimustoiminta on pientä, ja toimintaa ylläpidetään lähinnä ammattikorkeakoulun ja oman taimiston tarpeita varten. Oikeanlaisella varustetasolla ja työvaatetuksella pyritään vähentämään viljelmän saastumisriskiä. Lepaalla laboratoriovaatetukseen kuuluu valkoinen laboratoriotakki, kengänsuojat tai sisäkengät. Vapaaehtoisesti laboration käytänteitä noudattaen voidaan käyttää myös hiussuojaa, kasvusoijaa ja kumihanskoja. Laboratori-

osta tulisi löytyä erilliset tilat valmisteluille, siirtämiselle ja kasvattamiselle. (Hartmann ym. 2014, 679.)

Valmistelutilassa kasvualustat valmistellaan siirrostamista varten. (Hartmann ym. 2014, 728.) Valmistelutilassa kasvatusastiat pestään huolellisesti, valmistetaan ravintoalusta, ja steriloidaan välineet, astiat ja ravintoalustat. Sterilointiin käytetään autoklaavia, joka käyttää sterilointimenetelmänä kuumennusta ja painetta. Ravintoalusta on valmis käytettäväksi steriloinnin jälkeen. (Hartmann ym. 2014, 728-730.)

Kasvin siirtäminen ravintoalustalle tapahtuu useimmiten laminaarivirtauskaapissa, joka on steriili tila. Laminaarivirtauskaappi steriloidaan pyyhkimällä sen pinnat alkoholilla kostutetulla rätillä ennen työskentelyn aloittamista. Laminaarivirtauskaapin koneiston puhaltama ilmavirta pitää huoneilman epäpuhtaudet pois solukkoviljelmältä. Koneiston puhaltama ilma on myös huolellisesti suodatettua. (Hartmann ym. 2014, 730.) Työntekijä huolehtii omien käsiensä desinfioinnista alkoholilla sekä työvälineiden oikeasta steriloinnista lasihelmisterilisaattorin tai alkoholin pois liekittämisen avulla (Hartmann ym. 2014, 740-741; Bonga & von Anderkas 1992, 63). Kasvien sterilointiin tai preparointiin käytettäviä astioita käytetään käytännössä vain kerran. Astioina käytetään kannellisia petrimaljoja ja lasipurkkeja. Myös joitakin kuumennusta kestäviä muovisia astioita voi olla käytössä. Astiat tulee sulkea huolellisesti, kun laminaarivirtauskaapista poistutaan.

Mikroviljelmien kasvattamiseen on varattu erillinen kasvatushuone, jonka viljelyolosuhteita voidaan säätää. Viljelylämpötila, ilmankosteus ja valon määrä pyritään pitämään kasveille optimaalisissa arvoissa. Viljelyastiat asetetaan huoneessa oleville hyllyille kasvivalojen alle. Huoneeseen ei päästetä luonnonvaloa, joten esimerkiksi huoneessa olevat ikkunat on pimennetty. (Hartmann ym. 2014, 731.)

3.3 Mikrolisäämisen vahvuudet ja heikkoudet

Mikrolisäystä käytetään pääasiassa kasvien lisäämiseen, varsinkin massal lisäämiseen tietyillä tärkeillä viljelykasveilla sekä lajeilla, joilla muut lisäyskeinot eivät ole kaupallisesti tuottavia. Sitä käytetään myös kasvien puhdistamiseen kasvipatogeeneistä, perimän muunteluun, uhanalaisten kasvien lisäämiseen, kasvigeenivarantojen säilytykseen kloonattavassa muodossa, emokasvituotantoon ja tutkimukseen. (Hartmann ym. 2014, 667-670; Huhtama 2013, 22-23.) Lepaan mikrolisäyslaboratorio ylläpitää useita viljelmiä, jotka toimivat joko oman taimiston lisäysmateriaalia tai ovat tilaajille aloitettuja ja ylläpidettäviä viljelmiä. Tutkimustoimintaa harjoitetaan muun muassa opinnäytetöiden muodossa.

Mikrolisäämisessä on kuitenkin sekä vahvuuksia että heikkouksia, joiden suhdetta tulee pohtia ennen mikrolisäyksen aloittamista. Ennen aloittamista tulisi pohtia onko jonkin kasvin mikrolisääminen hyödyllistä ja taloudellisesti kannattavaa.

3.3.1 Vahvuudet

Mikrolisäämisen vahvuuksiksi on lueteltu tasalaatuisuus, nopeus tuotannossa sekä viljelmän kehityksessä, runsas versonmuodostus, tautivapaus ja ympärivuotinen tuotanto. Tasalaatuisuudesta on etua, kun kasveja istutetaan paljon kerrallaan ja kaikkien yksilöiden haluttaisiin näyttävän samalta. Tasalaatuisuus on myös eduksi puutarhaliikkeissä ja taimitarhoilla, joilla asiakas valitsee myytävien kasvien joukosta yleensä sen parhaimman näköisen yksilön ja myymättömät saattavat päätyä hävikkiin.

Mikrolisääminen on nopeampi keino lisätä kasveja, sillä aloitusvaiheen jälkeen kasvuvauhti on ripeä muihin kasvullisiin menetelmiin verrattuna. Viljelämä kehittyy nopeasti vaiheeseen, jossa sitä voidaan monistaa. Monistamisessa yhdestä aloituksesta voidaan pilkkoa useita uusia kasvin paloja, varsinkin jos aloituksen versonmuodostus on ollut runsasta. Tähän vaiheeseen voidaan päästä jo 4-6 viikon päästä aloituksien tekemisestä. Tavallisesti muut kasvulliset lisäysmenetelmät kestävät koko kasvukauden ajan tai kauemmin. Monistusvaihe voidaan tehdä jo ennen kun kasvukausi on alkanut ja mikrolisätyt taimet ovat valmiit juurruttamiseen ja karaisemiseen jo heti kasvukauden alussa. Aloituksen tekeminen ei vaadi isoa emokasvia, vain pieni näyte riittää. Valmistelevat vaiheet työllistävät työntekijöitä jo talven aikana eli sesongin ulkopuolella. (Huhtama 2013, 22-23.)

Kasveista voidaan tehdä mikrolisäyksen avulla tautivapaita eli niiden ei tulisi sisältää kasvipatogeeneja. Patogeenit voivat olla näkyviä eli aiheuttaa kasveissa oireita ja lopulta johtaa kasvin kuolemaan. Aina ne eivät kuitenkaan näy tai ole aktiivisia, joten ensin piilevätkin patogeenit tulee saada esille tunnistusta varten. Tunnistuksen jälkeen kasvista otetaan oireeton pala, kuten kärkipistokas tai kärkikasvupiste. Nämä kasvin osat voivat olla tautivapaita jo itsessään, mutta patogeeneja voidaan tappaa altistamalla kasvi korkealle lämpötilalle tai lisäämällä kasvia siemenestä, joista aina-kaan virukset eivät useimmiten välity eteenpäin. Tarkoitus on tuottaa puhdaita taimia, joita voidaan käyttää jatkossa mikrolisäyksen emokasvimateriaalina. (Hartmann ym. 2014, 648-654.)

3.3.2 Heikkoudet

Mikrolisäyksen heikkouksiksi listataan sen olevan kallista, vaativan erityisosaamista, oikeiden menetelmien löytämistä, riski epäonnistumiseen, hontelo kasvu ja liikaversoisuus. Mikrolisäyslaboratorion perustaminen ja ylläpito erikoisvarusteineen on kallista. Erilaisia laitteita, välineitä, astioita, aineita ja kemikaaleja on paljon, joita tarvitaan erilaisten kasvien mikrolisäämiseen. Kasveilla on erilaisia vaatimuksia preparoinnin, steriloinnin, alustojen ja jatkokasvatuksen suhteen. Työskentely mikrolisäyslaboratoriossa vaatii henkilökunnalta erityisosaamista ja työkokemusta alalta, jota vain sivutaan puutarha-alojen koulutuksissa. Työvoima on yksi mikrolisäyslaboratorion suurin menoerä.

Jokainen uusi kasvi vaatii perehtymistä ja oikean menetelmän löytämistä, joka vie aikaa ennen kuin kasvia päästään mikrolisäämään. Se voi edellyt-

tää useiden epäonnistuneiden erien valmistamista ja jälleen uusien menetelmien testaamista. Testimäärät ovat suhteellisen pieniä, mutta määrän tulee olla sen verran iso, että valittujen menetelmien toimivuus tai toimimattomuus voidaan todeta. Jokainen erä vaatii kuitenkin samat toimenpiteet kuin oikeaa kaupallista viljelmää aloittaessa, ja siihen käytetty aika ja materiaalit ovat pois kaupallisesta tuotannosta. Tämä opinnäytetyö pyrkii löytämään aasiankilpikierrolle toimivan tavan lisätä sitä mikrolisäyslaboratoriossa.

Toisinaan mikrolisämisessä jotkin kasvit saattavat kasvaa lajille tai lajikkeelle epätyypillisesti. Kasvu voi olla honteloa, juuret muodostua eri tavalla, kukinta myöhästyä tai kasvi muodostaa paljon versoja. Epätyypillinen kasvu ei ole toivottua ja jatkokasvatukseen toivotaan vahvoja taimia. Siirrostamisen aikana voidaan tehdä valintaa, jolloin vain parhaimmat yksilöt jatkokasvatetaan. (Hartmann ym. 2014, 619-621; Huhtama 2013, 22-23.)

3.4 Kasvihormonit

Kasvihormonit ovat yksinkertaisista molekyyleistä muodostuneita aineita, jotka vaikuttavat kasvin aineenvaihduntaan ja kehitykseen jo pieninä pitoisuuksina. Kasvihormonit ovat pleiotrooppisia eli ne vaikuttavat useampaan kuin yhteen asiaan. Niitä ei muodostu niiden tuottamiseen erikoistuneissa rauhasissa, vaan suurimmassa osassa koko kasvia. (Srivastava 2002, 139.) Tavallisesti kasvihormoneiksi luetellaan auksiini, sytokiniini, gibberelliini, abskissihappo ja etyleeni (Srivastava 2002, 141). Kasvihormonien joukkoon on vähitellen hyväksytty jasmonaatti ja ryhmä steroidihormoneja. Kasvihormoneista auksiineilla ja sytokiniineillä on tärkeä merkitys mikrolisämisessä (Hartmann ym. 2014, 736). Ensimmäisenä kasvihormoneista löydettiin auksiini indolylyietikkahappo (IAA) 1930-luvulla ja sen jälkeen muut 1950-1980-luvuilla. Kasvihormonit voivat olla luonnostaan esiintyviä tai synteettisesti valmistettuja. (Srivastava 2002, 141-152.)

3.4.1 Auksiinit

Ensimmäisenä löydetty auksiini indolietikkahappo (IAA) löydettiin, kun kasvin havaittiin taipuvan sivusta tulevaa valoa kohden. Taipuminen johtuu version epätasaisesta kasvusta sen eri puolilla. Varjon puolella oleva solukko kasvaa nopeammin kuin valon puolella oleva, jolloin verso taipuu. IAA on luonnollisesti esiintyvä kasvihormoni, joka osallistuu lähes kaikkeen kasvin kasvuun ja kehitykseen. Se ylläpitää apikaalidominanssia, aiheuttaa solunjakautumista, version taipumista valoa kohti ja juurien suuntautumista maata kohti. (Srivastava 2002, 155-156.) Indolivoihappo (IBA) on myös luontaisesti esiintyvä auksiini. Sitä käytetään laajalti kaupallisesti. Sitä hyödynnetään myöhäisversojen muodostumiseen versoon tai lehtipistokkaaseen, ja juurruttamiseen. (Srivastava, 2002, 166.)

Synteettisiä auksiineja ovat α -naftaleenietikkahappo (NAA) ja 2,4-dikloorifenoksietikkahappo (2,4-D). Niitä käytetään auksiinien aiheutta-

mien reaktioiden aikaansaamiseksi synteettisesti valmistetuilla aineilla. Synteettisetkin auksiinit ovat monivaikutteisia, mutta NAA:ta käytetään versopistokkaiden juurruttamiseen ja 2,4-D:tä kalluksen tuottamiseen solukkoviljelmällä. (Srivastava 2002, 167.)

3.4.2 Sytokiniinit

Sytokiniinit löydettiin jo melko varhain vuonna 1913, mutta mikrolisäystekniikoiden kehittymättömyyden takia niitä pystyttiin tutkimaan ja hyödyntämään mikrolisäamisessä vasta 1940- ja 1950-luvuilla. Sytokiniinien huomattiin aiheuttavan voimakasta solunjakautumista solukkoviljelmällä. (Srivastava 2002, 191.) Sytokiniinit toimivat usein yhdessä auksiinien kanssa, kuten kontrolloivat apikaalidominanssia, silmujen ja juurten muodostumista, silmujen puhkeamista ja estävät lehtien vanhenemista. (Srivastava 2002, 202.)

Ensimmäisenä sytokiniineistä osattiin valmistaa kinetiiniä (KIN) painekattilassa steriloidusta sillin (*Clupea harengus*) maidista. Kinetiini on valmistapansa mukaan synteettinen, vaikka se on löydetty käsittelemällä luonnollista ainetta. Luonnollisia sytokiniinejä alettiin etsiä kasveista, jotka muodostavat luonnostaan sytokiniiniä. Australiassa onnistuttiin vuonna 1963 eristämään sytokiniiniä maissista (*Zea mays*), joka nimettiin zeatiiniksi. (Srivastava 2002, 191-192.)

Bentsyladeniini (BA) ja 6-bentsyyliaminopuriini (BAP) olivat ensimmäisiä synteettisiä sytokiniinejä kinetiinin löydön jälkeen. Niitä käytetään laajalti mikrolisäyksessä. Käyttöä nostaa helppo saatavuus ja edullinen hinta. Isopentenyladeniini (2iP) on toinen käytetty synteettinen sytokiniini. Solukkoviljelmällä sytokiniinit nujertavat apikaalidominanssin ja vapauttavat sivu- tai hankasilmuja dormanssista. (George & Debergh 2008, 209; Hartmann ym. 2014, 736.)

3.5 Kasvien regeneraatiokyky

Kasvi käy läpi elämänsä aikana kolme vaihetta: nuoruusvaihe (juveliini-vaihe), täysi-ikäisyys ja vanheneminen (senesenssi). Juveliinista kasvista tulee täysi-ikäinen, kun kasvin kärkekasvusolukko on kyvykäs tuottamaan kukkia. Nuoruusvaiheen kasvin solut pystyvät tuottamaan vain vegetatiivista kasvua. Yksivuotiset ruohovartiset kasvit käyvät läpi koko elämänsä kaaren yhden kasvukauden aikana kun taas pitkäikäiset puut saattavat tavoittaa täysi-ikäisyyden vasta vuosien kuluttua. Täysi-ikäiseksi muuttuminen on ympäristön antamien ärsykkeiden, kuten päivän pituuden ja kylmyyden yhteisvaikutuksen tulos. (George & Debergh 2008, 404-405.)

Nuoruusvaiheen kasvit tuottavat versoja, joista otetut pistokkaat pystyvät helposti tuottamaan jälkijuuria ja *in vitro* lisäyksessä kasvavat hyvin. Vastaavasti täysi-ikäisestä kasvista otettu pistokas tuottaa jälkijuuria heikommien, varsinkin jos kyseessä on puuvartinen kasvi. Kasvullisessa lisäämisessä ja mikrolisäamisessä ongelma on, että kasvin siirtyessä täysi-ikäisyyteen, puuvartisten regeneraatio eli uusiutumiskyky menetetään ja

täysi-ikäisestä kasvista otettu materiaali on vaikeasti lisättävissä kasvullisesti.

Joidenkin kasvien nuoruvaiheen kasvu on erilaista kuin täysi-ikäisen kasvin kasvu. Eri vaiheissa lehdet saattavat olla erimuotoiset, versonkasvu olla eripituista, nuoressa versossa voi olla piikkejä ja nuori kasvi voi olla paremmin resistenssi kasvintuhoojille. Kasvin fenotyyppi tulee muuttumaan nuoruvaiheen jälkeen, joten kasvia ei voida lisätä nuoruvaiheessa havaittavien ominaisuuksien perusteella, sillä se ei ole kasvin todellinen fenotyyppi. Kasvullinen lisääminen vaatisi nuoren kasvin, joka tuottaa vegetatiivista kasvua, mutta jonka täysi-ikäisen fenotyyppi on tiedossa. (George & Debergh 2008, 406-407.)

Täysi-ikäisestä kasvista voidaan myös saada nuoria versoja. Tällöin ongelma ei muodostu, että ei tiedetä, millaisia ominaisuuksia täysi-ikäisellä kasvilla on, sillä täysi-ikäisen kasvin fenotyyppi on jo nähtävissä. Puuvartisten kasvien runko ja siitä nuoruvaiheessa haarautuneet versot ovat täysi-ikäisessä kasvissa kasvin vanhin osa, mutta ne säilyttävät nuoren kasvin ominaisuudet. Nuoruvaiheessa olevaa kasvua muodostuu myös versojen kärkiin, juuri- ja kantovesoista, alas leikatun kasvin uusista versoista ja vartetun kasvin jaloversosta. Kasvukauden ulkopuolella nuoruvaiheen versoja voidaan saada aikaan hyötämällä kasveja. (George & Debergh 2008, 407.)

3.6 Infektiot ja muut kasvua heikentävät tekijät

Infektioita voivat aiheuttaa kooltaan niin pienet kuin suuretkin infektioiden aiheuttajat (Uosukainen 1997, 11). Infektioiden aiheuttajien pääsy solukkoviljelmälle saattaa saastuttaa sen jo muutaman päivän sisällä ja viljelmä on silloin käyttökelvoton. Siksi ne ovat epätoivottuja solukkoviljelmällä. Infektioiden aiheuttajat hyötyvät joko itse kasvista tai käyttävät ravinnokseen samoja ravintoaineita kuin kasvit eli ravintoalustan ravinteita. Ne myös viihtyvät kosteissa elinolosuhteissa, jotka vallitsevat kasvatusastioiden sisällä. (Hartmann ym. 2014, 645, 678.)

3.6.1 Tuholaiset

Tuholaisia, joita esiintyy solukkoviljelmillä, ovat punkit ja ripsiäiset. Tuholaiset päätyvät solukkoviljelmiin joko lisäysmateriaalin, ihmisen, ilmassa olevien pölyhiukkasten tai muiden eliöiden mukana. Punkit ja ripsiäiset vahingoittavat kasvia syömällä kasvia, mutta ne myös tuovat mukanaan mikrobeja, kuten bakteerien ja sienien itiöitä. Tuholaiset havaitaan usein sieni- tai bakteerikasvustojen ilmentyessä. Silloin saastunta on jo usein laaja, sillä tuholaisilla on nopea lisääntymiskierto ja itiöt ovat levinneet niiden mukana. (Uosukainen 1997, 11.)

3.6.2 Mikrobit

Solukkoviljelmiä eniten saastuttaviksi mikrobeiksi luetellaan bakteerit, sienet, hiivat ja virukset. Muita mikrobeja ovat fytoplasmat, rikketsiat, spi-

roplasmat ja viroidit. (Uosukainen 1997, 11-13.) Mikrobien itiöitä esiintyy usein kasvien, työtasojen, käsien, vaatteiden ja työvälineiden pinnoilla. Ne kulkeutuvat solukkoviljelmiin lähes mistä tahansa. (Hartmann ym. 2014, 740.)

Mikrobien aiheuttamat infektiot jaetaan kolmeen ryhmään: aloitusvaiheessa havaittavat nopeat infektiot, aloitusvaiheen jälkeen havaittavat infektiot sekä krooniset ja piilevät infektiot. Aloitusvaiheen infektiot ovat usein seurausta huonosti onnistuneesta pintasteriloinnista. Myöhemmin havaittavat infektiot ovat vaikeasti ennen viljelmän aloittamista havaittavia ja ne saattavat aiheuttaa huomattavia tappioita viljelyn myöhemmässä vaiheessa. Piilevät infektiot tappavat solukkoviljelmiä ja heikentävät niiden kasvua. Virukset kuuluvat piileviin infektioita aiheuttaviin tekijöihin. (Uosukainen 1997, 11-12.)

3.6.3 Infektioiden ennaltaehkäisy

Infektioiden aiheuttajien pääsyä viljelmälle pyritään ehkäisemään ennalta erilaisin menetelmin ennen viljelmän aloittamista. Lisäysmateriaaliksi valitaan mahdollisimman puhdas emokasvi tai se voidaan kasvattaa kokonaan kasvihuoneessa tai hyötää siitä vain osa puhtaamman lisäysmateriaalin saamiseksi. Opinnäytetyössä käytettävät aasiankilpikierron lepotilaiset emokasvit hyödettiin puhtaamman lisäysmateriaalin takia Lepaan kasvihuoneella. Tärkeää on testata oireettomien kasvintuhoojien mahdollinen olemassaolo ja osata tunnistaa mahdolliset eri kasvintuhoojien aiheuttamat oireet, jotta ne voidaan poistaa parhaaksi todetulla tavalla, jos poistaminen on mahdollista. Jos infektiot ilmenevät jo noin viikon sisällä, infektio on usein peräisin kasvin pinnalla olevista mikrobeista, sillä kasvin sisältä tulleiden virusten aiheuttamat infektiot ilmenevät vasta pidemmän ajan kuluessa. (Uosukainen 1997, 11-12; Leppäkoski 12.4.2016.)

Mikrolisäyslaboratorion henkilökunta voi toiminnallaan ja valituilla menetelmillä pyrkiä ehkäisemään saastumisriskiä. Ravintoalustaan lisättävä Bacto Peptone edistää infektioiden nopeampaa ilmentymistä, jolloin infektioitunut viljelmä voidaan poistaa puhtaiden läheisyydestä (Uosukainen 1997, 12). Bacto Peptone on ravintoalustaan lisättävää jauhemaista ainetta, joka toimii ravintoalustassa typen lähteenä, jota viljelmälle mahdollisesti päätyneet mikrobit voivat käyttää energian lähteenä ja lisääntyä nopeasti. Henkilökunta pukeutuu laboratorioissa normien mukaisesti, työskentelee laminaarivirtauskaapissa, steriloi astiat, alustat ja työvälineet ennen käyttöä ja niiden käytön aikana mikrolisäyslaboratoriosta riippuen sen käyttämisestä tavoista.

3.6.4 Pintasterilointi

Lisäysmateriaalin pintasterilointi on lähes väistämätöntä tehdä aina, sillä kasvin pinnalla on mikrobeja. Nuoruvaiheessa olevista kasvinosista otettu lisäysmateriaali on usein helpompi pintasteriloida kuin kasvin vanhemmista osista otettu lisäysmateriaali. Pintasteriloinnin onnistumiseen vaikut-

taa olennaisesti myös millä kasvullisuusvyöhykkeellä emokasvi kasvaa. Kosteissa trooppisissa metsissä kasvavien kasvien pintasterilointi epäonnistuu todennäköisemmin kuin kasvullisuusvyöhykkeellä, jossa on viileää ja kuivaa. (Bonga & von Anderkas 1992, 58.)

Steriloitavat kasvinosat, joissa on pihkaiset silmusuomut tai kasvinosassa on jälsi, voidaan steriloida kastamalla kasvinosa alkoholiin ja polttaa se pois liekittämällä. Kova pinta suojaa kasvia tuhoutumiselta. Kasveilla, joilla ei ole tällaista pintaa, ei voida käyttää tällaista sterilointimenetelmää. Silloin pintasterilointiin käytetään natrium- tai kalsiumhypokloriittia. Natrium- ja kalsiumhypokloriitti ovat aineita, joita käytetään valkaisuaineina. Niiden hypokloriittipitoisuus on 6 % tai 12 %. Aineet laimennetaan veteen sterilointikäyttöä varten esimerkiksi 1 % vahvuiseksi. Liian vahva hypokloriittipitoisuus tai jos kasvi on herkkä hypokloriitille, saattaa tuhota solukkoa. (Bonga & von Anderkas 1992, 60.)

Steriloitavan kasvinosan pinnan rakenne on olennainen osa steriloinnin onnistumisessa. Sileä ja karvaton pinta steriloituu paremmin kuin pinta, jossa on paljon koloja ja karvoja. Epätasaisessa pinnassa on paljon kohtia, joissa on ilmakuplia, jotka estävät steriloivan aineen kontaktin kasvin pinnan kanssa. Tekemällä ennen hypokloriittikäsittelyä alkoholikäsittely esimerkiksi etanolilla, alkoholin tulisi poistaa version pinnalta vettä hylkivää vahaa ja pihkaa. Näin ollen hypokloriittikäsittelyn tulisi olla tehokkaampi ja saada paremman kontaktin pinnan kanssa. (Bonga & von Anderkas 1992, 61.)

Fallenius (2012) vertaili *Alnus*-suvun puilla toteutetussa opinnäytetyössä neljää eri sterilointimenetelmää, jossa natriumhypokloriittikäsittelyn aika ja pitoisuus vaihtelivat. Sterilointikäsittelyissä tehtiin natriumhypokloriittikäsittely ennen alkoholikäsittelyä. Parhaimmillaan vain 39 % infektoitui, mutta huonoimmillaan infektoitui kaikki eli 100 %. Parhain tulos saatiin laimeimmalla (1 %) hypokloriittipitoisuudella ja käsittelyajalla (10 minuuttia), kun taas huonoin tulos väkevimmällä (2 %) hypokloriittipitoisuudella samalla käsittelyajalla. Sterilointien onnistumisprosentit vaihtelevat myös sterilointierittäin. Samalla tavalla toistettu sterilointi voi antaa seuraavalla sterilointikerralla erilaisen onnistumisprosentin.

3.6.5 Fenolit

Solukkoviljelmää aloittaessa, emokasvista irrotetaan jokin pienempi osa, joka asetetaan ravintoalustalle. Irrottaminen vaatii leikkaamista saksilla tai veitsellä, jolloin kasviin aiheutuu haava. Haavan aiheutuminen stimuloi solujen erilaistumattomuutta, solunjakautumista ja kalluksen tuottoa (Bonga & von Anderkas 1992, 63). Haavauman aiheutuminen vapauttaa kasvista fenoleita, jotka ovat myrkyllisiä eritteitä (Bonga & von Anderkas 1992, 64, 67). Jonkin ajan päästä aloituksesta fenolit alkavat kuolettaa solukkoa ja kudokset ruskettuvat haavapinnasta pois päin. Lopulta koko aloitus kuolee, jos ruskettumiseen ei osata varautua ennakoilta tai ryhtyä toimenpiteisiin ennen kuin on liian myöhäistä.

Fenolien aiheuttamat ongelmat ovat suuremmat puuvartisilla kuin ruohovartisilla kasveilla. Fenolien määrään vaikuttavat myös kasvilaji, emokasvin ikä, vuodenaika, solukon ikä ja käytettävän solukon sijainti emokasvissa. Ruskettumista voidaan ennaltaehkäistä pitämällä emokasvia hämärässä tai pimeässä pari viikkoa ennen lisäysmateriaalin irrottamista. Ruskettumista voidaan vähentää myös antioksidanttikäsittelyllä, upottamalla aloitukset veteen, ravintoalustan aineiden pitoisuuksilla tai lisäaineilla. (Bonga & von Anderkas 1992, 65, 68.) Aloituksien teon jälkeen paras tapa hallita ruskettumista on leikata ruskettunut osa pois ja siirtää aloitukset uusiin ravintoalustoihin (Bonga & von Anderkas 1992, 67).

3.7 Hyötäminen

Hyötämisellä tarkoitetaan dormanssin eli lepotilan purkautumista ja se saa aikaan silmujen puhkeamisen. Kasvin dormanssi voidaan purkaa kasvukauden ulkopuolella kasvihuoneessa keinotekoisesti lämmityksen ja keinovalojen avulla. Hyödettävänä materiaalina voidaan käyttää siementaimia, pistokkaita, varrennettuja taimia ja emokasvista kerättyjä oksia. Myös koko emokasvi voidaan tuoda kasvihuoneeseen, jos se sinne kokonsa puolesta mahtuu. (Bonga & von Anderkas 1992, 55.)

Emokasvien hyötämisellä kasvihuoneella saadaan aikaan puhtaampaa lisäysmateriaalia kuin ulkoilmassa. Ulkoilma sisältää enemmän taudinaiheuttajia kuin kasvihuoneilma, vaikka kasvihuoneilmakaan ei ole täysin puhdasta. Kasvihuoneilman koostumusta ja huoneessa vallitsevia olosuhteita voidaan kuitenkin säätää kasveille sopiviksi. Kasvihuoneessa infektioiden aiheuttajia pyritään ennaltaehkäisemään sekä torjumaan tehokkaasti. Ulkona kasvavista emokasveista kerätty lisäysmateriaali voi olla vaikea puhdistaa taudinaiheuttajista. (Bonga & von Anderkas 1992, 55-56.) Emokasvin version koloihin, halkeamiin tai muihin epätasaisiin kohtiin jää helposti mikrobeja, joita ei saada poistetuksi edes pintasteriloinnilla (Hartmann ym. 2014, 677). Hyödetyn emokasvimateriaalin pinnalle ei ole kerääntynyt niin paljon taudinaiheuttajia ulkona kasvavaan emokasvimateriaaliin verrattuna. (Hartmann ym. 2014, 739-740.) Hyötäminen ei kuitenkaan poista kasvin sisäisiä infektioiden aiheuttajia, kuten viruksia. Hyötäminen edesauttaa lähinnä kasvin pinnalla olevien mikrobien vähenemistä.

Hyödettyjen versojen tulisi olla hieman alaosasta puutuneita. Puutumaton version kärki on liian pehmeää käytettäväksi. Sterilointikäsittelyt voivat hajottaa kudoksen ja olla myrkyllisiä, ja siten tehdä materiaalista käyttökelvotonta. (Bonga & von Anderkas 1992, 61.) Aasiankilpikierron lisäysmateriaalina päätettiin käyttää version keskiosan hankasilmuja, jotka olivat puutuneempia kuin version kärkiosa.

3.8 Ravintoalustat

Ravintoalusta muodostuu makro- ja mikroravinteista, energianlähteestä, joka on yleensä sokeri, vitamiineista, hormoneista sekä mahdollisista lisäaineista. Alustareseptien makro- ja mikroravinteet muodostuvat nestemäisistä kantaliuoksista. Kantaliuokset ja muut aineet liuotetaan ioninvaihdet-

tuun veteen ja siten ravintoalusta on aluksi nestemäistä. Hyydyttävänä aineena toimii usein agar, joka hyydyttää ravintoalustan huoneenlämmössä. Reseptien kemikaaleja säilytetään erikseen niille tarkoitettussa lukitussa kaapissa ja valmista ravintoalustaa tai kantaliuoksia säilytetään kylmiössä paremman säilyvyyden takia. (Hartmann ym. 2014, 734.)

Käytössä on muutamia kaupallisia valmisreseptejä, kuten MS (Murashige & Skoog), WPM (Woody Plant Medium, Llyod & McCown) ja AND (Anderson), jotka sopivat useimmille solukkoviljelmille. Useimmat kasvit vaativat myös kasvihormonien, eritoten auksiinien ja sytokiniinien, lisäämistä. Erilaisten lisäaineiden lisääminen voi vahvistaa kasvihormonien vaikutusta, kuten adeniinisulfaatti vahvistaa BAP:in tai kinetiinin vaikutusta. Tällöin varsinaisen kasvihormonin pitoisuus voidaan valita pienemmäksi, mutta vaikutus pysyy samana. (Khan, Misra, Sharma, Shukla & Ramteke, 2014.)

3.9 Aloitusaloitusten valitsemiseen vaikuttaneet tekijät

Aasiankilpikierron mikrolisäyksessä käytetyistä aloitusaloitustoista ei löydy julkaistuja artikkeleita tutkimuksista, joissa olisi vertailtu tai tutkittu jonkin reseptin kelvollisuutta suoraan aasiankilpikierrolle. Aasiankilpikierrolle sopivia aloitusaloitustoja voivat olla alustat, joita on käytetty kilpikierron sukulais- tai heimokasveilla.

Lepaan mikrolisäyslaboratoriossa on aiemmin tehty mikroviljelmän aloituksia kilpikierrosta eri reseptejä kokeillen. Niistä parhaimmaksi osoittautui yhdistelmä MS + BAP 0,5 mg/l + adeniinisulfaatti 50 mg/l + glutamiini 150 mg/l (Meena ym. 2012). Aloituksesta selvisi monistusvaiheeseen yhteensä kuusi aloitusta. Sterilointierä oli kolme ja jokaisessa sterilointierässä oli viisi silmua. Alkuperäisessä kokeessa vertailtiin eri kasvihormonien vaikutusta versonmuodostukseen MS-alustalla kasvilla *Cocculus hirsutus*. Mikroviljelmä aloitettiin aikuisen kasvin juurien jälkisilmuista lähteneistä versoista. *C. hirsutus* on köynnöskasvi, joka on Intiassa uhanalainen lääkekasvi. Se kuuluu aasiankilpikierron kanssa kilpikiertokasvien heimoon (*Menispermaceae*). (Meena ym. 2012.)

Tinospora cordifolia on myös aasiankilpikierron heimokasvi. *T. cordifolia* on tärkeä lääkekasvi, osittain puuvartinen köynnös ja kuuluu kilpikiertojen heimoon (Sharma ym. 2015). *T. cordifoliaa* koskevassa tutkimuksessa oli tutkittu MS- ja WPM-alustojen sekä niiden yhdistelmän sopivuutta kyseisen kasvin kärkisolukkoviljelmällä. Tutkimuksessa oli myös vertailtu sytokiniinien BAP ja kinetiini eri pitoisuuksien vaikutusta versonkasvuun. Parhaat tulokset MS-alustalla saavutettiin BAP- ja kinetiinipitoisuuden ollessa 2,0 mg/l. BAP:lla 53 % aloituksista lähti kasvuun ja kinetiinillä 50 %. WPM-alustalla parhaat tulokset saatiin samalla pitoisuudella. BAP:lla 60 % aloituksista lähti kasvuun ja kinetiinillä 53 %. (Sharma ym. 2015.)

4 AINEISTO

Opinnäytetyön tarkoitus oli perustaa Lepaan mikrolisäyslaboratorioon solukoviljelmä koeputkiin aasiankilpikierrasta. Onnistuneet aloitukset siirrostettiin monistusalustoille jatkokasvatukseen. Opinnäytetyö keskittyi aloituksien tekoon. Onnistunut solukoviljelmä voisi toimia lisäysmateriaalina eräälle suomalaiselle taimistolle.

Kirjallisuudesta etsittiin 3-4 erilaista aloitus-alustaa, jotka sopivat kilpikierrolle tai sen sukulaiskasveille. Aloitus-alustat tehtiin reseptien mukaisesti ja lisättiin muut tarvittavat ainesosat. Samalla etsittiin aloituskasvimateriaalia varten erilaisia hyväksi todettuja sterilointimenetelmiä. Tavoitteeksi asetettiin valmistaa aloitus-alustaa yksi litra, josta tulee 70 koeputkellista yhtä alustaa kohden. Kaikkia valmisteltuja koeputkia ei käytetä aloituksien aloittamisvaiheessa, vaan ne käytetään myöhemmässä vaiheessa aloituksien siirtämiseen uudelle kasvualustalle aloituksien kasvaessa liian isoiksi tai fenolien vaikutuksien ehkäisemiseen.

Koeputkia havainnoitiin viikon välein niin kauan, kunnes kaikki aloitukset olivat infektoituneet, kuolleet tai olivat kasvaneet tarpeiksi isoiksi monistusalustalle siirtämistä varten. Havainnointikerroilla infektoituneiden ja kuolleiden aloitusten määrä kirjattiin ylös havainnointitaulukkoon (Liite 3) sterilointierittäin ja alustoittain eriteltynä. Infektoituneiden ja kuolleiden aloitusten koeputket poistettiin koeputkitelineestä.

4.1 Lisäys- ja aloitusmateriaalin valitseminen

Opinnäytetyön lisäysmateriaaliksi valittiin kolme Lepaan puistossa kasvavaa aasiankilpikierron yksilöä. Kyseiset taimet olivat kasvaneet Lepaan puistossa jo 1980-luvulta ja ne valittiin niiden läheisen kasvupaikan takia (Leppäkoski 19.4.2016). Kaksi emokasvia kaivettiin ylös maasta syksyllä 2015 ja siirrettiin isoihin 10 litran astioihin. Kolmas emokasvi oli valmis astiataimi. Emokasvit siirrettiin taimiston viileään kellariin talvivarastoon.

Emokasvit siirrettiin kellarista 20.1.2016 hyötöön Lepaan kasvihuoneen koehuoneeseen 1. Niiden kasvualusta lämpeni päivän verran ennen koehuoneeseen siirtämistä. Koehuoneessa lämpötila oli päivällä 20 °C ja yöllä 18 °C. Emokasveja kasteltiin viikoittain ja niiden kasvamista seurattiin oikean aloitusajankohdan löytämiseksi. Syyt hyötämiseen oli puhtaamman lisäysmateriaalin saaminen ja opinnäytetyön aloituksen ajankohta eli talvi, jolloin kasvit ovat lepotilassa eivätkä muodosta uusia versoja. Aloitus on helpompi tehdä kasvavasta versosta.

Emokasvit (Kuva 3.) lähtivät suurimmaksi osaksi kasvuun juurien jälkisolmuista. Puutunut vanhempi kasvusto leikattiin pois, sillä jälkisolmuista lähteneet versot olivat juuri sitä haluttua materiaalia, joten vanhan version hankasolmuista lähtenyt materiaalia ei varsinaisesti tarvittu. Aloitusmateriaalina käytettiin hyötyneiden versojen hankasolmuja.



Kuva 3. Hyödön jälkeen kasvuun lähteneet aasiankilpikierron emokasvit Lepaan kasvihuoneella 24.2.2016. (Kuva: Paulina Tirkkonen 2016)

4.2 Aloituselustojen valitseminen

Kilpikierto on sekä ruoho- että puuvartinen kasvi, joten sen aloituselustana voidaan käyttää sekä MS-elustaa (Liite 1) että WPM-elustaa (Liite 2). Näitä elustatyyppejä käytettiin aloituselustojen perusreseptinä. Kumpaakin käytetään myös Lepaan mikrolisäyslaboratoriossa säännöllisesti.

Aloituselustoiksi valittiin aasiankilpikierron heimokasveilla tutkittuja reseptejä, sillä reseptejä ei löytynyt suoraan aasiankilpikierrolle. Alustoiksi valittiin MS-pohjainen aloituselustaresepti, jota oli käytetty tutkimuksessa kasvilla *C. hirsutus* (Meena ym. 2012). Aloituselusta sisälsi lisäaineet adeniinisulfaatti ja glutamiini. Muiksi aloituselustoiksi valittiin WPM- ja MS-pohjaiset aloituselustareseptit, jota oli käytetty tutkimuksessa kasvilla *T. cordifolia* (Sharma ym. 2015). Alustat eivät sisällä lisäaineita, mutta niiden BAP-pitoisuus on korkeampi. Paremman vertailun vuoksi haluttiin valita vielä toinen WPM-pohjainen aloituselusta, joka sisältäisi lisäaineet adeniinisulfaatti ja glutamiini. *C. hirsutuksella* käytetty MS-pohjainen aloituselusta muokattiin WPM-pohjaiseksi, ja BAP-pitoisuus ja lisäaineet pidettiin samoina. Sokerin määrä asetettiin samaksi sekä MS- että WPM-

alustoille eli 30 g/l. Aloitusalus-
alustat ja niitä vastaavat koodinimet.

Taulukko 1. Aasiankilpikierron aloitusalus-
alustat ja niitä vastaavat koodinimet.

Aloitusalusresepti	Koodinimi
MS + BAP 2,0 mg/l (Sharma ym. 2015)	Alusta1
MS + BAP 0,5 mg/l + adeniinisulf. 50 mg/l + glut. 150 mg/l (Meena ym. 2012, muokattu)	Alusta2
WPM + BAP 2,0 mg/l (Sharma ym. 2015)	Alusta3
WPM + BAP 0,5 mg/l + adeniinisulf. 50 mg/l + glut. 150 mg/l (Meena ym. 2012)	Alusta4

5 MENETELMÄT

Opinnäytetyön toiminnalliseen osuuteen kuului aloitusalus-
alustojen valmistus, aloitusmateriaalin kerääminen sekä aloituspal-
ojen sterilointi. Aloitusalus-
toja tehtiin neljää erilaista, joten se vaati neljän ravintoliuoksen valmista-
misen mikrolisäyslaboratoriossa. Alustat voitiin valmistaa ennen kuin
emokasvit olivat tarpeeksi hyötyneitä aloitusmateriaalin keräämistä varten,
sillä ne säilyivät kylmiössä. Aloitusmateriaali oli steriloitava parin päivän
sisällä kun se oli kerätty, jotta versot eivät nuudu liikaa. Steriloinnit jakau-
tuivat kahdelle eri viikolle, jolloin sterilointeja tehtiin kahtena eri päivänä.
Jakautuminen johtui aikataulullisista syistä. Päivän aikana tehtiin useampi
sterilointierä.

5.1 Aloitusalus- alustojen tekeminen

Aloitusalus-
alustat tehtiin kaikki samana päivänä 25. tammikuuta 2016 Lepaan
mikrolisäyslaboratoriossa. Ravintoliuos tehtiin litran dekantterilasiin, jo-
hon alustat koottiin nestemäisistä kantaliuoksista. Sokerina käytettiin sak-
karoosia ja sitä lisättiin kaikkiin alustoihin 30 g/l. Kaikkien liuoksien
pH:ksi päätettiin asettaa 5,8. Säädon jälkeen liuokseen lisättiin agar (8,4
g/l) ja Bacto Peptone. Liuosta keitettiin aineiden liukenemisen paranta-
miseksi 20 minuuttia lämpölevyllä, jossa oli myös magneettisekoittaja.

Alustat kaadettiin kannun avulla koeputkitelineissä oleviin koeputkiin
(Kuva 4.). Yhteen koeputkeen kaadettiin noin 15 ml nestemäistä alustaa.
Jokaista alustaa saatiin yhdestä litrasta 65-66 koeputkellista. Jokainen
koeputki laputettiin tarralapulla, jossa on tieto alustan reseptistä ja valmis-
tuspäivämäärästä. Alustaa sisältävät koeputket steriloitiin autoklaavissa
120 °C:ssa 15 minuuttia 1 baarin ylipaineessa.



Kuva 4. Aasiankilpikierron aloitusalustakokeen 2016 aloitusalustat koeputkissa ennen sterilointia alustalla 4 valmistuspäivänä 25.1. Alusta on vielä lämmintä ja siksi koeputkeen on muodostunut höyryä. (Kuva: Paulina Tirkkonen 2016)

5.2 Sterilointi

Sterilointimenetelmän valinnassa apuna käytettiin Lepaalla aiemmin tehtyä opinnäytetyön aiheesta vastaavaa aloitusalustakoetta aasiankilpikierrolla, jossa vertailtiin eri alustareseptejä sekä sterilointikäsittelyjä. Yksi sterilointikäsittelyistä oli muita parempi saatujen tulosten perusteella. Sterilointikäsittely sisälsi hammasharja- ja saippuapesun sekä alkoholi- että natriumhypokloriittikäsittelyn. Sterilointikäsittely on yleisesti käytössä kasvussa olevalle versolle Lepaan mikrolisäyslaboratoriossa. Käsittelymenetelmää muokattiin hieman aiemman kokeen tulosten perusteella.

Sterilointimenetelmä lyhyesti:

1. Hammasharjapesu
 2. Erisept-pesu (5 tippaa/150 ml) ioninvaihdetussa vedessä, sekoitus magneettisekoittajalla 10 minuuttia, huuhtelu ioninvaihdetulla vedellä
- Laminaarivirtauskaapissa:
3. Alkoholikäsittely etanolilla (Etax A12, 70 %) 30 sekuntia, huuhtelu ioninvaihdetulla vedellä
 4. Sterilointikäsittely natriumhypokloriitilla (NaOCl, 1 %) 150 ml + Tween 20 (5 tippaa), sekoitus magneettisekoittajalla 10 minuuttia, 4 x huuhtelu ioninvaihdetulla vedellä

Sterilointimenetelmässä aloitusmateriaaliksi valitut versot pestiin ensin hammasharjalla juoksevan veden alla pintalian poistamiseksi. Aloitusmateriaali pilkottiin paloiksi, joista jokainen pala sisälsi yhden hankasilmun. Lehtiruodit pyrittiin pitämään kiinni versossa, mutta ne saattoivat irrota

pesun aikana. Antiseptinen puhdistusemulsio Erisept poisti version pinnalta likaa ja pölyä. Saippuapesun jälkeen siirryttiin työskentelemään laminaarivirtauskaappiin, jossa aloituspalojen pinta saatiin steriiliksi. Aloituspalat käsiteltiin etanolilla (Etax A12 70 %) ja natriumhypokloriitilla (NaOCl 1 %). Alkoholi- ja natriumhypokloriittikäsittelyn järjestystä vaihdettiin päittäin ohjeeseen verrattuna, jotta ilmakuplat saadaan pois aloituspalojen pinnalta. Kyseistä työjärjestystä käytetään Lepaan mikrolisäyslaboratoriossa yleisesti. Käsittelyiden jälkeen aloitusmateriaali huuhdeltiin ioninvaihdetulla vedellä (Hartmann ym. 2014, 740).

Steriloinnin jälkeen aloituspalan molemmista päistä ja lehtiruodin päästä leikattiin pois steriloinnissa vaurioitunutta solukkoa. Varsinainen aloituspala oli noin 1,5 cm pitkä versionpala, jossa oli yksi hankasilmu. Sterilointierässä oli aloituspaloja sekä version tyveltä, keskeltä että kärjestä. Näitä eri kasvin osista otettuja paloja pyrittiin saamaan tasaisesti jokaiselle alustalle. Aloituspala asetettiin koeputken aloitusalueeseen pystyasentoon, silmu ylöspäin (Kuva 5.). Jokaisessa sterilointierässä oli 8-10 silmua.



Kuva 5. Aasiankilpikierron alustakokeen 2016 steriloituja aloituspaloja koeputkissa 24.2.2016 steriloinnin A1 jälkeen alustalla 3. (Kuva: Paulina Tirkkonen 2016)

Sterilointieriä tehtiin neljänä eri päivänä (Taulukko 2.) 24.3., 26.3., 7.3. ja 9.3. Eri erät nimettiin A1, A2, A3 ja A4. Nimessä kirjain A viittaa sterilointimenetelmään, ja jos sterilointimenetelmiä olisi käytetty useampia, aakkosia olisi jatkettu eteenpäin. Numero nimessä vastaa erien järjestystä.

Taulukko 2. Aasiankilpikierron aloituslustoakokeessa 2016 tehdyt sterilointierät, niiden tekopäivät ja aloitusten kappalemäärät.

Steriloinnin koodi	Pvm.	Aloituksia yhteensä	Aloituksia/alusta
A1	24.2.	8	2
A2	26.2.	36	9
A3	7.3.	36	9
A4	9.3.	32	8
<i>Yhteensä</i>		112	28

Aloitukset vietiin kasvamaan mikrolisäyslaboratorion kasvatushuoneeseen. Kasvatushuoneen valotus on 16 tuntia vuorokaudessa. Valoina toimivat luonnonvaloa jäljittelevät Osramin 21 W/840 loisteputkilamput, joita on yksi jokaisen hyllyn päällä. Kasvatushuoneen lämpötila on 24 °C +/- 2 °C ja huoneessa on yhden baarin ylipaine.

6 TULOKSET

Lisäysmateriaalia sterilointiin yhtä aloituslustoaa varten yhteensä 28 aloitusta eli aloituksia saatiin yhteensä 112 kappaletta. Havainnointeja tehtiin neljän viikon ajan maaliskuun aikana kerran viikossa päivinä 7.3., 15.3., 24.3. ja 30.3. Havainnoinneissa kirjattiin ylös infektoituneiden ja kuolleiden aloitusten lukumäärä ja kasvun edistymisestä otettiin valokuvia. Alustareseptit oli nimetty koodinimillä (Taulukko 3.).

Taulukko 3. Aasiankilpikierron aloituslustoakokeessa 2016 käytettyjen aloituslustojen koodinimet.

Aloituslustoaresepti	Koodinimi
MS + BAP 2,0 mg/l (Sharma ym. 2015)	Alusta1
MS + BAP 0,5 mg/l + adeniinisulf. 50 mg/l + glut. 150 mg/l (Meena ym. 2012, muokattu)	Alusta2
WPM + BAP 2,0 mg/l (Sharma ym. 2015)	Alusta3
WPM + BAP 0,5 mg/l + adeniinisulf. 50 mg/l + glut. 150 mg/l (Meena ym. 2012)	Alusta4

6.1 Tulokset havainnointipäivittäin

Ensimmäisellä havainnointikerralla 7.3. havainnoitavana olivat vain erät A1 ja A2, sillä A3 ja A4 tehtiin vasta ensimmäisen havainnoinnin jälkeen. Koeputkia oli 11 kappaletta jokaista alustaa eli yhteensä 44 kappaletta. Kaikilla aloituslustoilla esiintyi infektoita, mutta ei yhtään kuollutta aloitusta (Taulukko 4.). Infektoita esiintyi 12 aloituksessa ja jäljelle jäi 32 aloitusta.

Taulukko 4. Infektoituneiden ja kuolleiden aloitusten kappalemäärät ja prosentuaaliset osuudet aloituksista aasiankilpikierron aloitusalustakokeessa 2016 havainnointipäivänä 7.3. sterilointikäsittelyistä A1 ja A2. Aloituksia oli 11 kappaletta/alusta.

	Infektiot		Kuolleet	
	kpl	%	kpl	%
Alusta1	3	27	0	0
Alusta2	3	27	0	0
Alusta3	2	18	0	0
Alusta4	4	36	0	0
<i>Yhteensä</i>	12	27	0	0

Toisella havainnointikerralla 15.3. havainnoitiin kaikki neljä sterilointierää. Havainnoitavia koeputkia oli 100 kappaletta. Yhteismäärästä 112 kappaletta on vähennetty 12 edellisellä havainnointikerralla poistettua infektoitunutta aloitusta. Kaikilla alustoilla esiintyi infektoita, mutta ei yhtään kuollutta aloitusta (Taulukko 5.). Infektioita esiintyi 29 aloituksessa ja jäljelle jäi 71 aloitusta.

Taulukko 5. Infektoituneiden ja kuolleiden aloitusten kappalemäärät ja prosentuaaliset osuudet aloituksista aasiankilpikierron aloitusalustakokeessa 2016 havainnointipäivänä 15.3. sterilointikäsittelyistä A1, A2, A3 ja A4. Aloituksia oli yhteensä 100 kappaletta.

	Infektiot		Kuolleet	
	kpl	%	kpl	%
Alusta1	6	21	0	0
Alusta2	9	32	0	0
Alusta3	8	29	0	0
Alusta4	6	21	0	0
<i>Yhteensä</i>	29	29	0	0

Ensimmäiset sterilointierät A1 ja A2 olivat kasvaneet toiseen havainnointikertaan mennessä lisäaineellisilla alustoilla 2 ja 4 niin pitkiksi, että ne tuli siirtää uusiin koeputkiin. Siirrostuksen aikana tapahtui virhe ja yksi jaettava alustan 2 aloitus päättyi alustalle 4 laskuvirheen takia. Samalla kerralla sterilointierät A1 ja A2 menivät sekaisin samojen alustojen osalta, joten eriä ei pysty enää havainnoimaan erikseen. Virhe johtui siitä, ettei aloituspäivämäärän tieto siirry uuteen koeputkeen, sillä tarralappu lisätään koeputkeen vasta työvaiheen jälkeen eikä tässä vaiheessa oltu tarkkana, mistä koeputkesta kukin kasvi oli peräisin. Sterilointierien sekoittaminen keskenään ei näy tuloksissa, sillä tuloksia ei tarkastella sterilointierittäin.

Kolmannella havainnointikerralla 24.3. havainnoitiin kaikki sterilointierät. Havainnoitavia koeputkia oli 71 kappaletta. Määrästä on vähennetty edellisillä havainnointikerroilla poistetut infektoituneet aloitukset. Kaikilla alustoilla esiintyi infektoita, mutta ei yhtään kuollutta aloitusta (Taulukko 6.). Infektioita esiintyi 26 aloituksessa ja jäljelle jäi 45 aloitusta.

Taulukko 6. Infektoituneiden ja kuolleiden aloitusten kappalemäärät ja prosentuaaliset osuudet aloituksista aasiankilpikierron aloitusalustakokeessa 2016 havainnointipäivänä 24.3. sterilointikäsittelyistä A1, A2, A3 ja A4. Aloituksia oli yhteensä 71 kappaletta.

	Infektiot		Kuolleet	
	kpl	%	kpl	%
Alusta1	5	18	0	0
Alusta2	4	14	0	0
Alusta3	7	25	0	0
Alusta4	10	36	0	0
<i>Yhteensä</i>	26	37	0	0

Neljännellä havainnointikerralla 30.3. havainnoitiin kaikki sterilointierät. Havainnoitavia koeputkia oli 45 kappaletta. Määrästä on vähennetty edellisillä havainnointikerroilla poistetut infektoituneet aloitukset. Kaikilla alustoilla esiintyi infektoita, mutta ei yhtään kuollutta aloitusta (Taulukko 7.). Infektioita esiintyi 5 aloituksessa ja jäljelle jäi 40 aloitusta.

Taulukko 7. Infektoituneiden ja kuolleiden aloitusten kappalemäärät ja prosentuaaliset osuudet aloituksista aasiankilpikierron aloitusalustakokeessa 2016 havainnointipäivänä 30.3. sterilointikäsittelyistä A1, A2, A3 ja A4. Aloituksia oli yhteensä 45 kappaletta.

	Infektiot		Kuolleet	
	kpl	%	kpl	%
Alusta1	0	0	0	0
Alusta2	1	4	0	0
Alusta3	2	7	0	0
Alusta4	2	7	0	0
<i>Yhteensä</i>	5	11	0	0

6.2 Eroavaisuudet aloituksien kasvutavassa

Tarkkailtaessa eri alustoilla kasvavia aloituksia, niiden kasvutavassa havaittiin eroja. Lisäaineellisilla alustoilla 2 ja 4 kasvaneet aloitukset kasvoivat pidemmiksi kuin lisäaineettomilla alustoilla 1 ja 3. Alustoilla 2 ja 4 aloitukset olivat kasvaneet yli 4 cm pitkiksi (Kuva 6.), kun taas alustoilla 1 ja 3 aloitukset olivat jääneet noin 2 cm pituisiksi. Kuvassa olevat aloitukset on valittu viimeisellä havainnointikerralla jäljellä olevien aloitusten joukosta ja ne edustavat keskipituista aloitusta. Lisäaineellisten ja lisäaineettomien aloitukset olivat fenotyypiltään myös erilaiset keskenään. Lisäaineellisilla alustoilla kasvaneet aloitukset vastasivat enemmän aikuisen aasiankilpikierron ulkonäköä kuin lisäaineettomilla alustoilla kasvaneet aloitukset.



Kuva 6. Aasiankilpikierron aloitusaluslakokeen 2016 aloitusalusloilta valittiin jokaiselta yksi aloitus pituuskasvuvertailuun. Viivain havainnoi aloituksien korkeutta senttimetreinä. Kuvasta nähdään myös aloituksien erot fenotyypissä. (Kuva: Paulina Tirkkonen 2016)

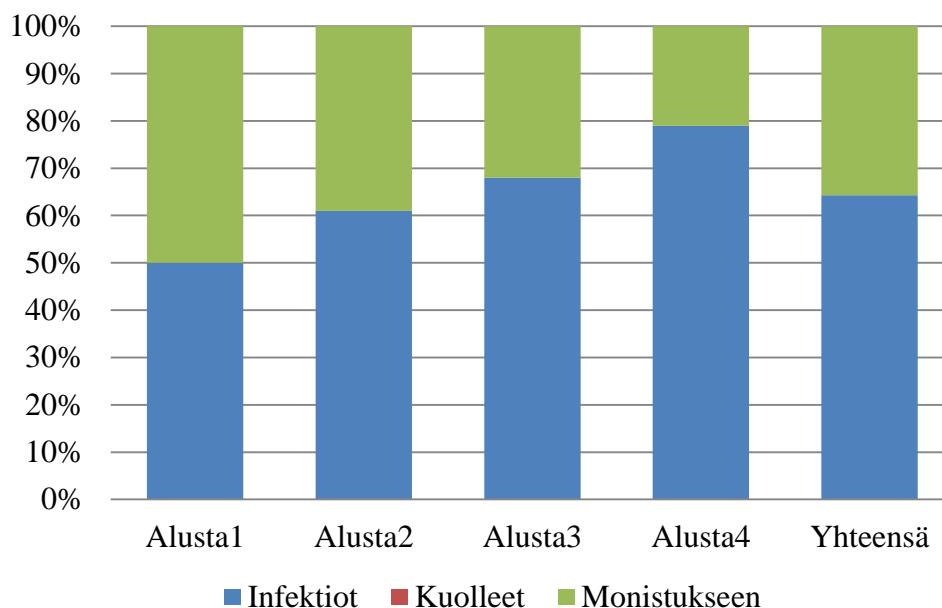
6.3 Monistusvaihe

Kuolleita aloituksia ei esiintynyt yhdelläkään havainnointikerralla. Infektioita puolestaan esiintyi jokaisella alustalla. Viimeisen havainnoinnin jälkeen jatkokasvatukseen eli monistusvaiheeseen siirtyi 40 kappaletta eli 36 % aloituksista (Taulukko 8.).

Taulukko 8. Monistukseen siirtyvien aloituksien kappalemäärät ja prosentuaaliset osuudet havainnoinnin lopussa. Aloituksia oli alunperin 28 kappaletta per alusta ja yhteensä 112 kappaletta.

Monistukseen siirtyvien aloituksien määrä	
Alusta1	14 (50 %)
Alusta2	11 (39 %)
Alusta3	9 (32 %)
Alusta4	6 (21 %)
<i>Yhteensä</i>	40 (36 %)

Infektoituneiden, kuolleiden ja monistusvaiheeseen siirtyneiden aloitusten määrät vaihtelivat alustoittain (Kuvio 1.). Alustalta 1 siirtyi 50 % monistusvaiheeseen, joka on eniten verrattuna muihin alustoihin. Toiseksi eniten eli 39 % aloituksia siirtyi alustalta 2 ja toiseksi vähiten eli 32 % alustalta 3. Alustalta 4 siirtyi monistusvaiheeseen 21 % ja se on vähiten muihin alustoihin verrattuna. Kuolleita ei esiintynyt yhdelläkään havainnointikerralla millään alustalla. Kokonaisuudessaan aloituksia infektoitui 64 % ja monistusvaiheeseen siirtyi 36 % aloituksista.



Kuvio 1. Infektioiden, kuolleiden ja monistukseen siirtyneiden aloitusten prosentuaaliset määrät aloitusten kokonaismääriin verrattuna eri alustoilla sekä kokonaismäärään verrattuna aasiankilpikierron aloitusaloitustakokeessa 2016. Kuolleita ei esiintynyt lainkaan.

Aloitukset siirrettiin monistusalustoille 30.3. ja 31.3. Lepaan mikrolisäyslaboratoriossa. Meena, Singh & Patni (2012) ehdottavat artikkelissaan monistusalustaksi MS + BAP 0,5 mg/l, jos halutaan lisätä massaa monistukseen ja MS + BAP 0,25 mg/l, jos halutaan versojen pitenemistä. Parhaimmat tulokset Sharma, Vashistha, Singh & Kumar (2015) saivat monistusalustoilla WPM + BAP 2,0 mg/l + KIN 1,0 mg/l ja WPM + BAP 1,0 mg/l + KIN 2,0 mg/l parhaimmat versomuodostusprosentit. Lepaan mikrolisäyslaboratoriossa aloitukset siirrettiin lopulta muille kuin tutkimuksissa ehdotetuille alustoille (Taulukko 9.).

Taulukko 9. Aloitusaloitusta vastaavat monistusalustareseptit, joita käytettiin aasiankilpikierron monistusalustoina Lepaan mikrolisäyslaboratoriossa 2016.

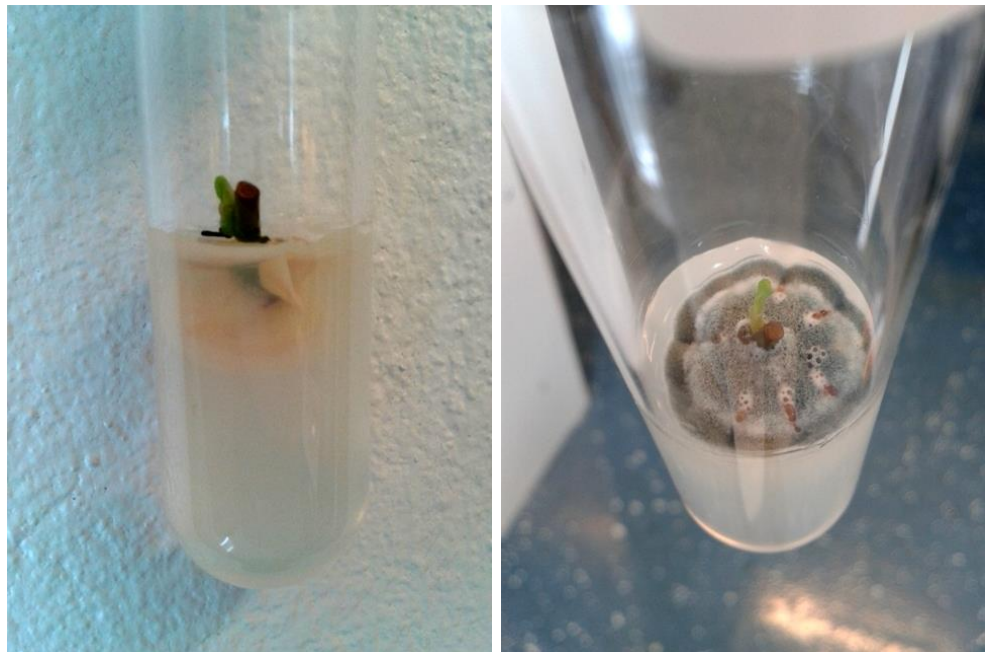
Aloitusalusta	Monistusalusta
MS + BAP 2,0 mg/l	MS + BAP 0,5 mg/l
MS + BAP 0,5 mg/l + adeniinisulf. 50 mg/l + glut. 150 mg/l	MS + BAP 0,2 mg/l + adeniinisulf. 50 mg/l + glut. 150 mg/l
WPM + BAP 2,0 mg/l	WPM + BAP 0,5 mg/l
WPM + BAP 0,5 mg/l + adeniinisulf. 50 mg/l + glut. 150 mg/l	WPM + BAP 0,2 mg/l + adeniinisulf. 50 mg/l + glut. 150 mg/l

Aloitusalustoilla käytettyjen lisäaineiden, adeniinisulfaatin ja glutamiinin, käyttö monistusalustoilla oli perusteltua, sillä niillä alustoilla kasvu näytti paremmalta aloitusaloitustakokeessa kuin ilman niitä. Monistusalustoilla kasvihormoni BAP:n pitoisuutta oli alennettu jokaisella alustalla, sillä

korkea kasvihormonipitoisuus aloituksen jälkeen voi aiheuttaa kasvullisia ongelmia.

6.4 Tulosten tulkinta

Tulosten perusteella infektiota esiintyi jokaisella aloituslustoilla ja jokaisessa sterilointierässä. Sterilointikäsitteilynä käytettiin vain yhtä käsittelyä, joten eri sterilointikäsitteilyjä ei voida vertailla keskenään. Infektiot olivat pääsääntöisesti kasvin ulkoisista mikrobeista aiheutuvia. Tämä voidaan päätellä infektioiden muodostumisesta aloituspalojen leikkaushaavan ympärille aloitusluston sisälle eikä esimerkiksi pinnalle selkeänä itiökasvustona (Kuva 7.). Infektiot myös ilmenivät jo noin viikon sisällä, joka viittaa kasvin pinnalla olleisiin mikrobeihin, sillä kasvin sisältä olleiden virusten aiheuttamat infektiot ilmenevät vasta pidemmän ajan kuluessa. (Leppäkoski 12.4.2016.)



Kuva 7. Aloituslustoilla eniten tavattu infektio kasvualustan sisällä (vas) ja yksittäin tavattu infektion itiökasvusto kasvualustan päällä (oik) aasiankilpikierron aloituslustakokeessa 2016. (Kuva: Paulina Tirkkonen 2016)

Sterilointikäsitteilyssä A3 kaikilla aloituslustoilla esiintyi havainnointipäivänä 15.3. suhteessa enemmän infektiota kuin muissa sterilointikäsitteilyissä. Tämän on voinut aiheuttaa lisäysmateriaalin eri keräyspäivä. Sterilointikäsitteilyjen A1 ja A2 lisäysmateriaali kerättiin samana päivänä 24.2., sillä materiaali tulisi käyttöön parin päivän sisällä. Vastaavasti sterilointikäsitteilyjen A3 ja A4 lisäysmateriaali on kerätty samana päivänä 7.3. samasta syystä. Ensimmäisenä keräyspäivänä emokasveissa havaittiin punkkeja, jotka torjuttiin pyretriinillä. Ensimmäinen kasvinsuojeluainekäsittely tehtiin heti ensimmäisen lisäysmateriaalin keräämisen jälkeen ja käsittely toistettiin noin päivää ennen seuraavaa keräyspäivää. Pyretriini haihtuu kasvin pinnalta usein nopeasti (Raid Suomi, 2016), mutta toista keräyspäivää edeltänyt kasvinsuojeluainekäsittely saattoi muodostaa kasvin pinnalle kerroksen, joka esti kasvin pinnalla olevien kasvintuhoojien poistamisen pintasteriloinnin aikana sterilointikäsitteilyä A3 tehtäessä. Sterilointikäsit-

telyyn A4 mennessä aine oli ehtinyt haihtua ja pintasterilointi onnistui. (Leppäkoski 12.4.2016.)

Havainnointien perusteella yksikään aloituksista ei kuollut. Tämä ilmentää, että lisäysmateriaali oli käyttökelpoista ja aloitusalus- tai alustat sisälsivät aineita, jotka edistivät aasiankilpikierron kasvua. Silmin nähtävien erojen (Kuva 6.) perusteella tuloksista voidaan todeta, että alustoilla 2 ja 4 aloitukset kasvoivat lajille tyypillisemmin ja pidemmiksi kuin alustoilla 1 ja 3. Aikuisen aasiankilpikierron varsi alkaa puutuessaan muuttaa väriä ruskeaksi. Nuori ja kasvava version kärki on vaaleanvihreä ja pehmeä. Kärjen lehtien muoto poikkeaa vanhempien osien lehtien muodosta. Aloitusalus- tai alustoilla 2 ja 4 kasvaneiden aloitusten varsi oli tyveltä tummempi, version kärki vaaleanvihreä, nivelväli pitkä ja lehdet jäljittelivät aikuisen aasiankilpikierron lehtien muotoa. Aloitusalus- tai alustoilla 1 ja 3 aloitusten versojen nivelväli jäi lyhyeksi, jolloin pituuskasvua oli vähän. Verso oli kauttaaltaan vaaleanvihreä, ja hyvin pehmeä ja hauras. Lehdet olivat pienet ja lähinnä aikuisen kasvin version kärkien lehtien muotoa jäljittelevät.

Aloitusalus- tai alustoilla 2 ja 4 kasvaneita aloituksia oli helpompi käsitellä monistusvaiheessa ja niistä saatiin parempi monistusprosentti kuin alustoilta 1 ja 3 kasvaneista aloituksista. Pitkät versot pystyttiin leikkaamaan kahteen tai jopa kolmeen osaan, jolloin monistusalus- tai alustalle saatiin enemmän materiaalia, joka on toivottavaa. Jokainen monistusalus- tai alustalle leikattu versionpala sisälsi vähintään yhden hankasilmun.

6.5 Kehitysideat

Aloitusten siirrostamisessa uusiin koeputkiin 15.3. tapahtui virheitä. Koeputkien erottamiseksi tarrat olisivat voineet olla erivärisiä tai keksiä jokin muu helposti havaittava keino erotella eri alustat virheiden välttämiseksi. Havainnointikerroilla koeputkitelineissä vierä vieressä olevia koeputkia piti käännellä, jotta näkyville saisi koeputken kyljessä olevan tarralapun. Samojen sterilointierien koeputket pyrittiin pitämään samassa koeputkitelineessä ja järjestellä niin, että samojen alustojen koeputket olivat vierekkäin. Alussa koeputkia oli kuitenkin paljon ja välillä niitä saattoi järjestellä väärin paikkoihin tai laittaa havainnoinnin jälkeen väärään tyhjään paikkaan. Värikoodaus olisi helposti erotettava keino tämän ongelman ratkaisemiseen.

Sterilointikäsittelyjen vertaileminen jäi kokonaan pois opinnäytetyöstä, sillä ensimmäiseksi kokeiltu sterilointikäsittelyn todettiin toimivan hyvin. Toisenlaisen tuloksen aikaansaamiseksi myös muita sterilointikäsittelyjä voisi kokeilla. Myös muut sterilointikäsittelyt voivat sopia aasiankilpikierron rooliin.

7 JOHTOPÄÄTÖKSET

Opinnäytetyössä suoritettun tutkimuksen perusteella aasiankilpikierron mikrolisääminen on mahdollista mikrolisäyslaboratorion keinoin. Valituilla aloitusaloistoilla saatiin aikaan kasvua ja kahdella niistä jopa hyvää kasvua. Perusreseptinä voidaan käyttää joko MS- tai WPM-reseptiä. Kasvutavassa ei juurikaan havaittu eroja näiden kahden perusreseptin välillä kahden lisäaineellisen tai kahden lisäaineettoman alustan kesken. Aasiankilpikierron mikrolisäämiseen käytettävä aloitusaloista vaatii perusreseptin lisäksi kasvihormonia. Kasvihormonina käytetty BAP toimi hyvin hyvän kasvun aikaansaamiseksi. Lisäaineet adeniinisulfaatti ja glutamiini kompensoivat kasvihormonin vaikutusta alustoilla 2 ja 4, joilla BAP-pitoisuus oli pienempi. Kasvu oli heikompaa alustoilla 1 ja 3, joilla ei ollut lisäaineita ja BAP-pitoisuus oli suurempi. Alustoilla 1 ja 3 BAP-pitoisuus ei ollut riittävä tai hyvä kasvu vaatii lisäaineita sen lisäksi.

Sterilointikäsittely saippuapesulla, etanolilla ja natriumhypokloriitilla sopi aasiankilpikierrolle, sillä kaikki aloitukset eivät infektoituneet. Sterilointikäsittely ei poistanut kaikkia kasvin pinnalla olleita mikrobeja, mutta 36 % kokonaismäärästä säilyi infektoitumatta, joka on hyvä tulos. Fallenius (2012) sai parhaimmillaan opinnäytetyössään tehdyllä hyvin vastaavanlaisella sterilointikäsittelyllä 21 % aloituksista monistusvaiheeseen asti. Sterilointikäsittely ei ollut liian voimakas, sillä se ei tappanut aloitusaloja. Vain muutaman millin pituinen osa solukkoa version päistä menetti värinsä ja kuoli. Koska kaikki aloitukset olivat samoista emokasveista, jotka olivat kasvaneet samoissa olosuhteissa, on vaikea sanoa mikä on aiheuttanut sen, miksi alustalla 1 esiintyi yli puolet vähemmän infektoita kuin alustalla 4. Infektoimisriskiin ei vaikuta alustan sisältämät aineet.

Mikrolisäyslaboratorion käytänteitä noudatettiin huolellisesti, jotta työntekijästä johtuvat infektiot saataisiin minimiin ja tuloksissa näkyisi vain pintasteriloinnin onnistuminen tai epäonnistuminen. Jostain muusta kuin pintasteriloinnin epäonnistumisesta johtuvia infektoita esiintyi vain yhdessä aloituksessa (Kuva 7.). Työskentelyssä käytettävät työvälineet ja astiat steriloitiin lämpökaapissa sisäpuolelta ennen laminaarivirtauskaappiin siirtymistä. Aloitusaloistoilla täytetyt koeputket steriloitiin autoklaavissa ennen käyttöä. Laminaarivirtauskaappiin siirrettävät astiat ja työvälineet sekä työntekijän kädet puhdistettiin alkoholilla ja työvälineiden toistuvaan sterilointiin käytettiin lasihelmisterilisaattoria. Aloituspalat pintasteriloitiin ennen aseptisiin olosuhteisiin eli koeputkiin laittoa. Työskentely suoritettiin rauhallisesti ja tarkasti, ja siinä onnistuttiin hyvin.

Mikään yksittäinen aloitusaloista ei ollut selkeästi muita parempi tai huonompi kuin toiset. Aloitukset menestyivät kaikilla alustoilla, sillä kuolleita aloituksia ei esiintynyt. Kaikkia näitä alustoja voidaan käyttää aasiankilpikierron lisäämiseen. Jos versoista halutaan lyhyitä, lisäaineet adeniinisulfaatti ja glutamiini jätetään pois alustasta. Lisäaineet lisätään alustaan, jos halutaan enemmän pituuskasvua. Kasvu aloitusaloistoilla 2 ja 4 oli parempaa, sillä ne voitiin jakaa useampiin osiin monistusaloistalle siirrettäessä. Näiden alustojen aloituksia oli myös helpompi käsitellä monistusvai-

heessa. Tulosten perusteella näitä lisäaineellisia alustoja voidaan todennäköisemmin käyttää *Menispermaceae*-heimon kasvien mikrolisäämiseen.

Aasiankilpikierron regeneraatiokyky ei osoittautunut ongelmaksi, sillä versot hyödettiin ja aloitukset olivat nuoruusvaiheessa. Ilman hyötöä kēsäpistokkaista otetuista hankasilmuista infektoitumistulos olisi voinut olla erilainen. Näyttöä siitä, auttoiko hyötäminen puhtaamman lisäysmateriaalin saamisessa, ei ole. Bongan & von Anderkasin (1992) mukaan on todennäköistä, että emokasvimateriaalin hyötäminen edistää puhtaamman aloitusmateriaalin saamista mikrolisäyksen käyttöä varten.

Fenolien aiheuttamaa ruskettumista esiintyi kaikkien alustojen aloituksilla. Ruskettuminen ei muodostunut suureksi ongelmaksi, sillä aloituksia voitiin siirtää kriittisessä vaiheessa uusiin koeputkiin samalle alustalle. Toimenpiteisiin ryhdyttiin vain sterilointikäsittelyjen A1 ja A2 alustoilla 2 ja 4 kasvaneiden aloitusten kohdalla, sillä näillä alustoilla aloitukset olivat kasvaneet kaikista kauiten ja ruskettuminen edennyt pisimmälle. Koeputkia oli valmisteltu enemmän kuin tarve vaati, joten fenolien aiheuttamaan ruskettumiseen osattiin valmistautua etukäteen. Ilman ajoissa uudelle alustalle siirtämistä aloitukset olisivat lopulta kuolleet.

Emokasvimateriaali toimi hyvin mikrolisäyksen aloituksessa. Aloituspalat oli helppo pintasteriloida pieniksi paloiksi pätkittyinä eikä aikaa vievää silmun preparointia mikroskoopin alla tarvinnut tehdä. Kaikki steriloidut aloitukset lähtivät kasvuun vähintään hankasilmusta, useat aloitukset useammastakin version piilosilmusta.

LÄHTEET

- Alanko, P. & Kahila, P. 2003. Köynnöskasvit. Jyväskylä: Tammi.
- Bonga, J.M. & von Aderkas, P. 1992. In Vitro Culture of Trees. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Brill, S. 1994. Identifying and Harvesting Edible and Medicinal Plants in Wild (and Not So Wild) Places. New York: Hearst Books.
- Fallenius, R. 2012. Alnus-suvun Kumpulan kantojen mikrolisäys. Hämeen ammattikorkeakoulun opinnäytetyö. Viitattu 23.5.2016.
https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/43654/Fallenius_Riikka.pdf?sequence=1
- George, E. F. & Debergh, P. C. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Micropropagation: Uses and Methods. 3rd Edition. Volume 1, The Background. Dordrecht: Springer.
- Hartmann, H. T., Kester D. E., Davies, F. T. & Geneve, R. L. 2014. Hartmann & Kester's Plant Propagation: Principles and Practices. Part 1. Harlow, Essex: Pearson Prentice Hall.
- Huhtama, L. 2013. Mikrolisäyksen etuja ja haittoja. Puutarha&Kauppa 12/2013, 22-23..
- Khan, M. K., Misra, P., Sharma, T., Shukla, P. K. & Ramteke, P. W. 2014. Effect of adenine sulphate on in vitro mass propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Academic Journals Vol. 8 (13), 4/2014. Viitattu 13.4.2016.
http://www.academicjournals.org/article/article1397466164_Khan%20et%20al.pdf
- Meena, M. K., Singh, N. & Patni, V. 2012. In vitro multiple shoot induction through axillary bud of *Cocculus hirsutus* (L.) Diels: A threatened medicinal plant. African Journal of Biotechnology Vol. 11 (12), 2/2012. Viitattu 5.1.2016.
<http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/100683>
- Preece, J. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Stock Plant Physiological Factors Affecting Growth and Morphogenesis. 3rd Edition. Volume 1, The Background. Dordrecht: Springer.
- Raid Suomi kotisivut. Raid House & Garden – aerosolit 150 ja 300 ml. Viitattu 4.5.2016.
<http://www.raid.fi/tuotteet/raid-house-garden-aerosolit-150-ja-300-ml/>
- Raven, P. H., Evert, R. F. & Eichhorn, S. E. 1992. Biology of Plants. Fifth Edition. New York: Worth Publishers.
- Senarath, W. T. P. S. K. 2010. In vitro propagation of *Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr. (*Menispermaceae*) - an endangered medicinal plant.

Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka, 38/2010. Viitattu 16.11.2015.

[http://www.researchgate.net/publication/236154140_In_vitro_propagation_of_Coscinium_fenestratum_\(Gaertn.\)_Colebr._\(Menispermaceae\)-an_endangered_medicinal_plant._J_Natl_Sci_Foundation_Sri_Lanka](http://www.researchgate.net/publication/236154140_In_vitro_propagation_of_Coscinium_fenestratum_(Gaertn.)_Colebr._(Menispermaceae)-an_endangered_medicinal_plant._J_Natl_Sci_Foundation_Sri_Lanka).

Sharma, H., Vashistha, B.D., Singh, N., Kumar, R. 2015. *Tinospora cordifolia* (willd.) Miers ex Hook. F & Thoms. (Menispermaceae): rapid in vitro propagation through shoot tip explants. International Journal of Recent Scientific Research Vol 6, 2/2015. Viitattu 16.11.2015.
<http://www.recentscientific.com/sites/default/files/1975.pdf>.

Srivastava, L. M. 2002. Plant Growth and Development - Hormones and Environment. San Diego: Academic Press.

Staden van, J., Zazimalova, E. & George, E. F. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists. 3rd Edition. Volume 1, The Background. Dordrecht: Springer.

Uosukainen, M. 1997. Kontaminaatiot solukkoviljelylaboratoriossa. Maatalouden tutkimuskeskuksen julkaisuja, sarja A 18.

Wilkinson, H. P. 1980. Kasvien maailma: Otavan iso kasvitietosanakirja 2, Herkkusienet-kopaali. Kilpikiertokasvit. Helsinki: Otava

SUULLISET TIEDONANNOT

Leppäkoski, S. 2016. HAMK Lepaan mikrolisäyslaboratoriovastava/tutkimusassistentti. Mikrolisäysaiheisia kysymyksiä päivinä 5.1., 25.1., 15.3., 30.3., 12.4., 13.4. ja 19.4.2016.

MURASHIGEN & SKOOGIN ALUSTA = MS

(Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. – Physiologia Plantarum 15: 473-497. Uosukainen, M. 1997. kontaminaatiot solukkoviljelylaboratoriossa. Maatalouden tutkimuskeskuksen julkaisu. Sarja A 18. 9–17.)

KANTALIUOKSET			RAVINTOLIUOS		
Nimike	Yhdiste	Pitoisuus	ml kantaliuos- ta/l	Pitoisuus	
				mg/l	mM
MS-pääravinteet (MS-makro)		g/l	100		
	NH ₄ NO ₃ ammoniumnitraatti (hapettava)	16,5		1650	20,6
	KNO ₃ kaliumnitraatti (hapettava)	19,0		1900	18,8
	CaCl ₂ x2H ₂ O kalsiumkloridi (ärsyttävä)	4,4		440	3,0
	MgSO ₄ x7H ₂ O magnesiumsulfaatti	3,7		370	1,5
	KH ₂ PO ₄ kaliumdivetyfosfaatti	1,7		170	1,25
	MS-hivenaineet (MS-mikro)			g/100 ml	1
	H ₃ BO ₃ boorihappo	0,620		6,2	0,1
	MnSO ₄ xH ₂ O mangaanisulfaatti (haitallinen)	1,690		16,9	0,1
	ZnSO ₄ x7H ₂ O sinkkisulfaatti (ärsyttävä)	0,860		8,6	0,03
	KI kaliumjodidi	0,083		0,83	0,005
	Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O natriummolybdaatti	0,025		0,25	0,001
	Erilliset kantaliuokset g/100 ml, mitataan pipetillä MS-MIKRO- kantaliukseen	*CuSO ₄ x5H ₂ O 0,025 g kuparisulfaatti (haitallinen) *CoCl ₂ x6H ₂ O 0,025 g kobolttikloridi (myrkyllinen)		10 ml 10 ml	
MS-Fe = WPM-F		g/500 ml	5		
Kantaliukseen punni- taan joko rau- ta(II)sulfaatti ja Titrip- lex III tai NaFe-EDTA	FeSO ₄ x7H ₂ O rauta(II)sulfaatti (ärsyttävä)	2,785		27,8	0,1
	Na ₂ EDTA etyleenidiamiinitetraetikkahapon natriumsuola = Titriplex III (ärsyttävä)	3,725		37,3	0,1
	tai NaFe-EDTA, EDTA:n natriumrau- ta(III)suola	tai 3,67		tai 36,7	tai 0,1
	MS-vitamiinit			g/250 ml	5
Kantaliuos jaetaan 5 ml:n eriin, jotka säilytetään syväjäässä (n. -20 °C).	tiamiinidikloridi (B ₁ -vitamiini)	0,005		0,1	0,0003
	nikotiinihappo (B-vitamiini) (ärsyttävä)	0,025		0,5	0,004
	pyridoksolihydrokloridi (B ₆ -vitamiini)	0,025		0,5	0,002
	glysiini (aminohappo)	0,1		2,0	0,027
Myo-inositoli (sokerialkoholi)		1,0g /100 ml	10	100 tai punnitaan erikseen	0,56
Sakkaroosi (ruokosokeri) punnitaan erikseen			30 g/l	30000	87,6
pH	Tilavuus → n. 4/5 lopullisesta tilavuudesta		5,7		
	Tilavuus → 1 litra mittapullossa				
Agar			8,5 g/l	punnitaan erikseen, liuotetaan kuumentamalla lämpölevyllä + magneettisekoitus	
Bacto Peptone			0,27 g/l		

WOODY PLANT MEDIUM = WPM-ALUSTA (BASAL MEDIUM)

(Lloyd, D. & McCown, B. 1980. Commercially-feasible Micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by Use of Shoot-tip Culture. The International Planta Propagator's Society. Combined Proceedings 30:421-427.; Uosukainen, M. 1997. Kontaminaatiot solukkoviljelylaboratoriossa. Maatalouden tutkimuskeskuksen julkaisuja. Sarja A 18, 9-17.)

KANTALIUOKSET			RAVINTOLIUOS		
Nimike	Yhdiste	Pitoisuus g / 100 ml	ml kantaliuosta/l	Pitoisuus	
				mg/l	mM
WPM-A	NH ₄ NO ₃ ammoniumnitraatti (hapettava)	2,00	20	400	5,0
	Ca(NO ₃) ₂ x4H ₂ O kalsiumnitraatti (hapettava, ärsyttävä)	2,78		556	2,4
WPM-B	K ₂ SO ₄ kaliumsulfaatti (hapettava)	4,95	20	990	5,7
WPM-C	CaCl ₂ x2H ₂ O kalsiumkloridi (ärsyttävä)	1,92	5	96	0,65
WPM-D	KH ₂ PO ₄ kaliumdivetyfosfaatti	3,4	5	170	1,25
	H ₃ BO ₃ boorihappo	0,124		6,2	0,1
	Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O natriummolybdaatti	0,005		0,25	0,001
WPM-E	MgSO ₄ x7H ₂ O magnesiumsulfaatti	7,4	5	370	1,5
	MnSO ₄ xH ₂ O mangaanisulfaatti (haitallinen)	0,446		22,3	0,13
	ZnSO ₄ x7H ₂ O sinkkisulfaatti (ärsyttävä)	0,172		8,6	0,03
	CuSO ₄ x5H ₂ O kuparisulfaatti (haitallinen)	0,005		0,25	0,001
WPM-F = MS-Fe Kantaliuokseen punnitaan joko rauta(II)sulfaatti ja Titriplex III tai NaFe-EDTA	FeSO ₄ x7H ₂ O rauta(II)sulfaatti (ärsyttävä)	0,557	5	27,8	0,1
	Na ₂ EDTA etyleenidiamiinitetraetikkahapon natriumsuola = Titriplex III (ärsyttävä) tai NAFe-EDTA, EDTA:n natriumrau- ta(III)suola	0,745 tai 0,734		37,3 tai 36,7	0,1 tai 0,1
WPM-G (vitamiinit) Kantaliuos jaetaan 5 ml:n eriin, jotka säilytetään syväjäähässä (n. -20 °C).	tiamiinidikloridi (B ₁ -vitamiini)	0,02	5	1,0	0,003
	nikotiinihappo (B-vitamiini) (ärsyttävä)	0,01		0,5	0,004
	pyridoksolihydrokloridi (B ₆ -vitamiini)	0,01		0,5	0,002
	glysiini (aminohappo)	0,04		2,0	0,027
Myo-inositoli (sokerialkoholi)		1,0	10	100 tai punnitaan erik- seen	0,56
Sakkaroosi (ruokosokeri) punnitaan erikseen			20 g/l	20000	58,5
pH	Tilavuus → n. 4/5 lopullisesta tila- vuudesta		5,2		
	Tilavuus→ 1 litra mittapullossa				
Agar			8,5 g/l	punnitaan erikseen, liuotetaan kuumenta- malla lämpölevyllä + magneettisekoitus	
Bacto Peptone			0,27 g/l		

HAVAINNOINTITÄULUKKO

[illegible]